

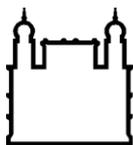
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**ESTUDO DO EFEITO DA MINOCICLINA NO DANO COGNITIVO
ASSOCIADO A MALÁRIA CEREBRAL**

EMÍLIO TELLES DE SÁ MOREIRA

Rio de Janeiro
2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

EMÍLIO TELLES DE SÁ MOREIRA

Estudo do Efeito da Minociclina no Dano Cognitivo Associado a Malária Cerebral

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

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

RIO DE JANEIRO

2017

Moreira, Emílio Telles de Sá

ESTUDO DO EFEITO DA MINOCICLINA NO DANO COGNITIVO
ASSOCIADO À MALÁRIA CEREBRAL / Emílio Telles de Sá Moreira. –
Rio de Janeiro, 2017.
100 f.; il.

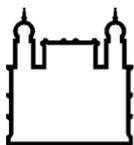
Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Biologia Celular e Molecular, 2017.

Orientador: Hugo Caire de Castro Faria Neto.

Co-orientadora: Patricia Alves Reis.

Bibliografia: f. 83-99

1. Malária. 2. Malária Cerebral. 3. Dano Cognitivo. 4. Microglia. 5.
Minociclina. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

EMÍLIO TELLES DE SÁ MOREIRA

**ESTUDO DO EFEITO DA MINOCICLINA NO DANO COGNITIVO
ASSOCIADO A MALÁRIA CEREBRAL**

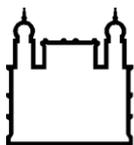
ORIENTADORES: Prof. Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
Dr^a. Patricia Alves Reis

Aprovada em: 14/03/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinicius Frias de Carvalho - Presidente
Prof. Dr. Leonardo José de Moura Carvalho
Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza
Prof. Dr^a. Mariana Conceição de Souza
Prof. Dr^a. Vanessa Estato de Freitas Almeida

Rio de Janeiro, 14 de Março de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

“Se eu tivesse o dom da profecia, se conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, se tivesse toda a fé, a ponto de mover montanhas, mas não tivesse amor, eu nada seria”.

1 Coríntios – Capítulo 13, Versículo 2.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela minha fé e por ser um grande refúgio espiritual durante a trajetória do Mestrado.

Aos meus orientadores Dr.^a Patricia Alves Reis e Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto.

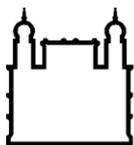
Ao Laboratório de Imunofarmacologia, em especial a Me. Tathiany Igreja da Silva, Me. Luciana Domett Siqueira, Me. Leandro Andrade, Natasha Lisboa, Millena Pais e Beatriz Brügger por todo apoio e colaboração.

À Dr.^a Clarissa M Comim, suas alunas Andreza Hoepers, Viviane Freiburger, Letícia Ventura, Regina Maldonado, e a Universidade do Sul de Santa Catarina (UNISUL) pela colaboração, pela incrível recepção e simpatia.

Agradeço a todos os meus familiares, em especial meu pai Agostinho de Campos Moreira, minha mãe Norma Celeida de Sá Moreira, meu irmão Henrique Augusto de Sá Moreira, meus avós paternos Sr. Joaquim Moreira Telles e Sr.^a Maria Rosa Moreira e meus avós maternos Sr. Sully Leite de Sá e Sr.^a Lisonete Oliveira de Sá, a minha namorada Carolina Fernandes Castro Ferreira e sua respectiva família. A base familiar foi fundamental para vencer as dificuldades e os momentos de apreensão, frustração, mas, principalmente, nos momentos de alegria e companheirismo.

**“I think it is possible for ordinary people to choose
to be extraordinary”.**

-Elon Musk



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DO EFEITO DA MINOCICLINA NO DANO COGNITIVO ASSOCIADO
A MALÁRIA CEREBRAL

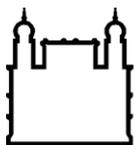
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Emílio Telles de Sá Moreira

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* e é transmitida aos humanos durante o repasto sanguíneo de fêmeas do mosquito *Anopheles spp.* O continente africano concentra o maior número de casos, a maior taxa de mortalidade e é onde há a maior incidência de infecções pela espécie *P. falciparum* que é a responsável pelo desenvolvimento do quadro de malária grave onde observamos a malária cerebral que é a pior complicação da malária grave, causando quadros de encefalopatia não-traumáticas em áreas endêmicas, levando ao desenvolvimento de sequelas potencialmente permanentes, como alterações neurocognitivas. Durante a malária cerebral há o aumento na produção de mediadores inflamatórios, produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, recrutamento de células do sistema imune, eventos de isquemia e reperfusão, comprometimento da barreira hematoencefálica, neuroinflamação, morte neuronal e ativação de células da micróglia, desempenhando papel importante na inflamação e no dano tecidual. No presente estudo foram utilizados animais C57/Black 6, infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) para o desenvolvimento dos eventos neuroinflamatório associados à malária cerebral experimental (MCE). Para avaliarmos o papel da ativação da micróglia durante a MCE, foi utilizado o fármaco minociclina que é um antibiótico da família das tetraciclina com propriedades anti-inflamatórias e capaz de inibir a ativação da micróglia em perfil pró-inflamatório. Os eventos neuroinflamatórios foram avaliados por meio dos experimentos de injeção de Azul de Evans, PCR em tempo real e *Western blotting*, A ativação das células da microglia foi avaliada por imuno-histoquímica com marcação para Iba-1 e a formação do dano cognitivo foi avaliado pelos ensaios comportamentais de *Freezing* e *Water-Maze*. A partir da metodologia desenvolvida, foi demonstrado que durante a malária cerebral experimental observamos os eventos de comprometimento da barreira hematoencefálica, ativação de células da micróglia, aumento da expressão de TNF- α , iNOS, aumento na ativação de caspase-3 e observamos o desenvolvimento do dano cognitivo a longo prazo – quinze dias após a infecção com PbA. Entretanto, o tratamento com minociclina foi capaz de modular negativamente a ativação da micróglia em um perfil pró-inflamatório, reduzindo a expressão de TNF- α , iNOS e prevenindo a formação da sequela cognitiva. Também demonstramos que a minociclina não alterou a expressão

de arginase-1, marcador do perfil de ativação M2. Os dados sugerem que as células da micróglia possuem papel importante nos eventos neuroinflamatórios durante a malária cerebral e a modulação da resposta da micróglia, com o uso de minociclina, foi eficaz no tratamento da neuroinflamação e na prevenção da formação do dano cognitivo a longo prazo.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**STUDY OF MINOCYCLINE'S EFFECTS ON COGNITIVE IMPAIRMENT
ASSOCIATED TO CEREBRAL MALARIA**

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Emílio Telles de Sá Moreira

Malaria is an infectious disease caused by protozoans of the gender *Plasmodium* and is transmitted to human hosts through females of *Anopheles spp* mosquitoes. The African continent concentrates the highest number of cases and the highest mortality rate. In addition, the main specie of *Plasmodium* in the African continent is the *Plasmodium falciparum*, which is the responsible for the development of the most severe complications during malaria infections, like the development of severe malaria and cerebral malaria. Cerebral malaria is the worst consequence of severe malaria, and is responsible of non-traumatic encephalopathies in endemic areas, leading to the development of sequels potentially permanent, like neurocognitive alterations. During cerebral malaria, there is an enhancement in the production of inflammatory mediators, oxygen and nitrogen reactive species (ROS and RNS), immune cells recruitment, events of ischemia and reperfusion, blood-brain barrier disruption, neuroinflammation, activation of microglial cells and neuronal death, leading to tissue damage and development of cognitive impairment. In the present study were utilized C57/Black 6 mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) to reproduce the neuroinflammatory events associated with the experimental cerebral malaria (ECM). To evaluate the role of the microglial cells activation in the cerebral malaria, we used the antibiotic minocycline, which has anti-inflammatory properties, and is capable of inhibit the microglial activation on a pro-inflammatory profile. The neuroinflammatory events were evaluated through Evans Blue injection, real time PCR and *Western blotting*, the microglial cells activation were evaluated through immunohistochemistry with Iba-1, and the cognitive impairment formation were evaluated through the behavioral tests of *Freezing* and *Water-Maze*. Based on the methodology developed, we showed that, during ECM, we observe the disruption of the blood-brain barrier, the activation of microglial cells in a pro-inflammatory profile, an enhancement in the expression of the mRNA of TNF- α and iNOS, enhancement of activated caspase-3, and we observed the development of long-term cognitive impairment fifteen days after the infection. The minocycline treatment showed to be capable of modulate the activation of microglial cells in a pro-inflammatory profile, reducing the expression of the mRNA of TNF- α and iNOS, reducing the activation of caspase-3 and, also, prevented the long-term cognitive impairment formation. In addition, we demonstrate that minocycline didn't altered the expression of arginase-1 – an important M2 marker. Our data suggest that microglial cells have an important role on neuroinflammatory events during ECM. Also, the modulation in the microglial response, using minocycline's treatment, was effective on the neuroinflammation and prevented the long-term cognitive impairment. However, minocycline wasn't capable of induce an M2 response through the microglial cells.

SUMÁRIO

Resumo	7
Abstract	9
1- Introdução	14
1.1.1 – Malária	14
1.1.2 – Epidemiologia da Malária	17
1.1.3 – Ciclo Biológico do <i>Plasmodium</i>	20
1.1.4 – Malária Cerebral	22
1.1.5 – Modelos Experimentais Murinos de Malária.....	26
1.2 – Neuroinflamação.....	28
1.3 – Microglia	30
1.4 – Memória	35
1.5 – Dano Cognitivo na Malária Cerebral	40
1.6 – Minociclina	43
2- Objetivos	45
2.1 – Objetivo Geral	45
2.2 – Objetivos Específicos	45
3- Material e Métodos	46
3.1 – Modelo Experimental	46
3.2 – Tratamentos	46
3.3 – Avaliação do Escore Clínico	46
3.4 – Desenho Experimental	47
3.5 – Contagem de Parasitemia	47
3.6 – Avaliação do Dano Cognitivo	48
3.7 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	49
3.8 – Marcação por Imunohistoquímica (IHC)	51
3.9 – <i>Western Blotting</i>	51
3.10 – Avaliação da Formação de Edema e Comprometimento da Barreira Hematoencefálica	53
3.11 – Análise Estatística.....	53
4- Resultados	55
4.1 – O tratamento com Minociclina não interferiu no desenvolvimento da malária e não preveniu a mortalidade dos animais	55
4.2 – O tratamento com minociclina preveniu a quebra da barreira hematoencefálica	56
4.3 – A administração de Minociclina reduziu a ativação de células da micróglia na região CA1 do hipocampo.....	57
4.4 – Os animais tratados com Minociclina apresentaram redução na expressão do m-RNA ICAM no hipocampo	60
4.5 – O tratamento com Minociclina reduziu os níveis do m-RNA iNOS no hipocampo.....	61
4.6 – O tratamento com Minociclina não alterou a expressão do m-RNA de HIF-1 α no hipocampo	62
4.7 – A Minociclina reduziu os níveis do m-RNA de TNF- α no hipocampo	63
4.8 – O tratamento com Minociclina não alterou os níveis de Arginase-1 no hipocampo e no córtex de animais infectados com <i>Plasmodium berghei</i> ANKA.....	64
4.9 – A Minociclina reduziu os níveis de Caspase-3 no modelo de malária cerebral experimental	66
4.10 – A administração de Minociclina preveniu a formação do dano cognitivo em camundongos infectados com PbA	68
5- Discussão	71
6- Conclusões	82
7- Referências	83

Lista de Siglas e Abreviaturas

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
ALS – Esclerose lateral amiotrófica
AMPA – α amino 3 hydroxyl 5 methyl 4 isoxazolepropinic acid
ARG – Arginase
AVC – Acidente vascular cerebral
A β – Amilóides β
CaMKII – Calcio calmodulina quinase II
DNA – Ácido desoxirribonucleico
eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
HIF – Fator induzido por hipóxia
ICAM 1 – Molécula de adesão intracelular 1
IFN – Interferon
IHC – Imunohistoquímica
IL – Interleucina
iNOS – Óxido nítrico sintase induzível
LPS – Lipopolissacarídeo
LTP – Potenciação de longa duração
MC – Malária cerebral
MCE – Malária cerebral experimental
MHC – Complexo principal de histocompatibilidade
mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro
NMDA – N methyl D aspartic acid
nNOS – Óxido nítrico sintase neuronal
NO – Óxido nítrico
NOS – Óxido nítrico sintase
O²⁻ - Ânion superóxido
ONOO- - Peroxinitrito
PAMPS – Padrões moleculares de reconhecimento de patógenos
PbA – *Plasmodium berghei* ANKA
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PFA – Paraformaldeído
PfEMP1 – *Plasmodium falciparum* erythrocyte membrane protein 1
PKA – Proteína quinase A
PKC – Proteína quinase C
RNS – Espécie reativa de nitrogênio
ROS – Espécie reativa de oxigênio
SNC – Sistema nervoso central
TLR – Receptor do tipo *Toll*
TNF – Fator de necrose tumoral
VNR – Receptor do tipo vitronectina

Lista de Quadros e Tabelas

Quadro 1 – Drogas comumente usadas em terapias combinadas no tratamento com artemisinina17

Tabela 1 – Modelos murinos de infecção com *Plasmodium*.....27

Lista de Figuras:

Figura 1 – Distribuição da malária no mundo.....	18
Figura 2 – Casos de malária confirmados por 1000 habitantes em 2014 no continente americano.....	19
Figura 3 – Proporção de casos de malária causadas por infecção pelo <i>P. falciparum</i> (azul) e <i>P. vivax</i> (bege), entre 2010 e 2014.....	20
Figura 4 – Esquema do ciclo biológico do <i>Plasmodium sp</i>	22
Figura 5 – Esquema de ativação da micróglia.....	31
Figura 6 – Principais regiões hipocampais envolvidas no processo de formação de memória.....	36
Figura 7 – Efeito do tratamento com minociclina na malária experimental.....	56
Figura 8 – Efeito do tratamento com minociclina na integridade da barreira hematoencefálica.....	57
Figura 9 – Efeito do tratamento com minociclina na ativação de células da micróglia na região CA1 do hipocampo.....	59
Figura 10 – Efeito da minociclina na expressão do m-RNA de ICAM 1 em amostras de hipocampo.....	61
Figura 11 – Efeito da administração de minociclina na expressão do m-RNA de iNOS no hipocampo.....	62
Figura 12 – Efeito do tratamento com minociclina na expressão do m-RNA de HIF-1 α em amostras de hipocampo.....	63
Figura 13 – Efeito da administração de minociclina na expressão do m-RNA de TNF- α em amostras de hipocampo.....	64
Figura 14 – Efeito do tratamento com minociclina na expressão de arginase em amostras de hipocampo e córtex.....	65
Figura 15 – Efeito do tratamento com minociclina nos níveis de caspase-3 de amostras de córtex.....	67
Figura 16 – Efeito da minociclina no dano cognitivo associado a malária cerebral experimental em modelo de <i>freezing</i>	69
Figura 17 - Avaliação do efeito da Minociclina no dano cognitivo associado à malária cerebral no modelo de <i>Water Maze</i>	70

1- Introdução:

1.1.1- Malária:

A malária é uma importante doença parasitária e é mundialmente reconhecida como um grave problema de saúde pública, sendo transmitida em mais de 100 países e incidindo em mais de 40% da população mundial. A malária é causada por protozoários da família Plasmodiidae, do gênero *Plasmodium*. Hoje são reconhecidas cinco espécies capazes de infectar a espécie humana, dentre elas: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malarie*, *P. ovale* e o *P. knowlesi*, que são transmitidas à espécie humana durante o repasto sanguíneo de fêmeas de insetos hematófagos do gênero *Anopheles* infectadas com *Plasmodium*. Existem, aproximadamente, 400 espécies diferentes de mosquitos do gênero *Anopheles*, onde 30 podem se tornar vetores após a ingestão de sangue infectado com plasmódios. A Organização Mundial da Saúde estimou 214 milhões de pessoas infectadas (intervalo de 149 – 303 milhões de pessoas) e uma mortalidade de 500 mil em 2015. A maioria dos casos ocorreram na região da África Sub-Saariana (88%), bem como a maior porcentagem das mortes ocorreram na mesma região (90%), acometendo principalmente crianças até 5 anos (Cox-Singh *et al.*, 2008; Garcia, 2010; Hansen, 2012; White *et al.*, 2014; OMS, 2010; OMS, 2015). Como resultado de programas de tratamento a pessoas diagnosticadas com malária e no combate aos vetores transmissores, principalmente em áreas endêmicas e onde doenças tropicais são negligenciadas, houve uma redução de 18% no número total de casos e de 48% no número total de mortes entre os anos 2000 e 2015. Desta forma, a malária deixou de ser a maior causadora da mortalidade (OMS, 2010) e passou a ser a 4ª maior causadora de mortes de crianças habitantes da região da África Sub-Saariana (OMS, 2015).

Os sintomas comuns às infecções por *Plasmodium spp.* caracterizam-se por febre, dores musculares, perda de apetite, prostração e dores de cabeça, porém os sintomas

clínicos e o tempo de manifestação variam de acordo com a espécie associada a infecção (Suh *et al.*, 2004).

Em especial, as infecções pelo *Plasmodium falciparum* desenvolvem as formas mais graves da malária e são responsáveis pela maior taxa de mortalidade associada a doença. Sintomas como alta carga parasitária, hipoglicemia, vômito, icterícia, febre, distúrbio de consciência e convulsões, são indicadores de prognósticos mais graves e podem preceder as seguintes formas clínicas da malária grave: anemia, insuficiência renal, disfunção hepática, formação de edema pulmonar, presença de hemoglobina na urina, distúrbios hemorrágicos e a malária cerebral (MC) (Suh *et al.*, 2004; Rosental, P. J., 2008; Wassmer, S. C., *et al.*, 2015).

O diagnóstico rápido e preciso é fundamental para a eficácia no controle da doença. Os impactos globais da malária vêm despertando interesse no desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas, não somente para áreas com recursos limitados, mas também em países desenvolvidos, onde a experiência no diagnóstico para malária é reduzida, por conta da baixa quantidade de pessoas infectadas (Bell *et al.*, 2005; Reyburn *et al.*, 2007). O diagnóstico da malária envolve a identificação de plasmódios, antígenos ou produtos presentes no sangue do paciente. O diagnóstico eficaz está sujeito a alguns fatores como: a espécie de *Plasmodium* infectante; os diferentes estágios do ciclo eritrocítico; a presença de mais de uma espécie de *Plasmodium* incidindo em áreas endêmicas; a relação entre transmissão e movimentação populacional; carga parasitária; imunidade e sintomas; o sequestro de eritrócitos parasitados em diversos tecidos; outras graves doenças infecciosas como a dengue ou HIV/AIDS; e o uso de medicação preventiva. Por conseguinte, a demora no diagnóstico e tratamento estão diretamente ligadas as taxas de mortalidade. Em algumas regiões, a transmissão da malária é tão intensa que uma parcela considerável da população infectada é assintomática. Logo,

pode-se acreditar que algumas pessoas tiveram seu sistema imunológico amadurecido, protegendo-os dos sintomas, mas não da infecção (Tangpukdee *et al.*, 2009). O diagnóstico rápido é importante para o início do tratamento com antimaláricos, bem como é importante no controle da transmissão. Em laboratório, a malária é diagnosticada por diferentes técnicas, como por exemplo o diagnóstico por gota espessa, pela reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real e o teste de diagnóstico rápido. Este último se baseia em detectar antígenos específicos de parasitos da malária, como por exemplo a *histidine-rich protein II* (proteína II rica em histidina – HRP-II), ou a *lactate dehydrogenase* (lactato desidrogenase – LDH) (Bhandari *et al.*, 2008; Vo *et al.*, 2007; Holland C.A. & Kiechle F.L., 2005; Tangpukdee *et al.*, 2009).

Após o diagnóstico, inicia-se o tratamento com drogas antimaláricas. A maioria dos antimaláricos atuam nas formas assexuadas do *Plasmodium*, em estágio eritrocítico da infecção. Devido à resistência do parasito, os combinados de artemisinina (Quadro 1) têm sido bastante utilizados nas infecções por *P. falciparum*. No continente americano, a cloroquina continua sendo utilizada no combate as infecções por *P. vivax*, embora já hajam casos de resistência no Brasil (Greenwood *et al.*, 2008; Pukrittayakamee *et al.*, 2014; Antony H. A., Parija S. C., 2016).

Quadro 1: Drogas comumente usadas em terapias combinadas baseada no tratamento com artemisinina (Antony H. A., Parija S. C., 2016).

Derivado de Artemisinina	Fármaco Antimalárico Adjuvante
Artesunato	Mefloquina
	Sulfadoxina/Pirimetamina
	Lumefantrina
	Amodiaquina
	Pironaridina
Dihidroartesanato	Piperaquina

O combate ao vetor, além do uso dos antimaláricos, é importantíssimo para o controle da transmissão da doença. Para isso, são utilizados mosquiteiros com inseticidas, a aplicação de inseticidas no interior das residências e o uso de repelentes aplicados diretamente na pele (Rahman, 2013).

1.1.2- Epidemiologia da Malária:

A malária é uma doença comum em países localizados nas zonas tropicais e subtropicais do globo (Figura 1), onde as condições climáticas são propícias para o desenvolvimento e perpetuação dos vetores (Tuteja, 2007).

As zonas onde predominam a malária podem ser agrupadas de acordo com as características epidemiológicas. No continente americano, encontram-se três zonas: o planalto mexicano em sua porção superior, com a predominância dos vetores *Anopheles quadrimaculatus* e *A. pseudopunctipennis*; a segunda zona abrange da América Central à costa norte da América do Sul e Venezuela, com a predominância do vetor *A. albimanus*; e a terceira zona que abrange a maior parte da América do Sul, com a predominância do vetor *A. darlingi* (OMS, 2013).



Figura 1: Distribuição da Malária no mundo. Mapa adaptado de dados da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2011).

No continente americano, aproximadamente, 112 milhões de pessoas estão sob risco de infecção, dentre eles, 20 milhões em regiões de maior incidência (>1/1000 habitantes) (Figura 2). O *P. vivax* é responsável por mais de 70% dos casos na América Latina, no entanto, o *P. falciparum* é responsável por 50% dos casos relatados na Guiana e Guiana Francesa, e 100% dos casos na República Dominicana e Haiti (Figura 3) (OMS, 2015).

No Brasil, assim como na América Latina, observa-se a prevalência dos casos malária pela infecção com *P. vivax*, contabilizando 84% do total de casos, seguido dos casos pela infecção com *P. falciparum* que contabilizou 16% (Figura 3). A região amazônica concentra a maioria dos casos no país (Figura 2). Em 2014 foram registrados 143.552 casos de malária, dentre eles 4.593 de casos importados de países que fazem fronteira com o Brasil. Em adição, também foram registradas 1.650 internações por malária na região amazônica no ano de 2014. O Brasil vem apresentando uma redução no

número de casos de malária a cada ano, mas ainda há a necessidade de melhoria nos processos de prevenção e controle da doença (MS, 2015).

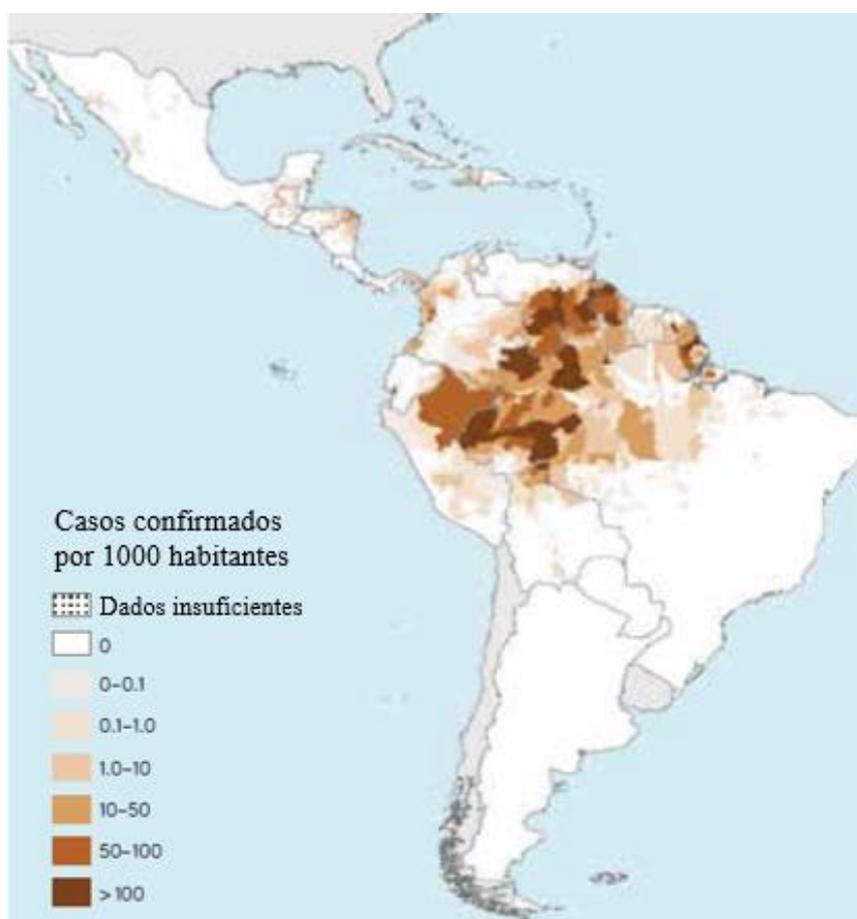


Figura 2: Casos de malária confirmados por 1000 habitantes em 2014 no continente americano (adaptado de OMS, 2015).

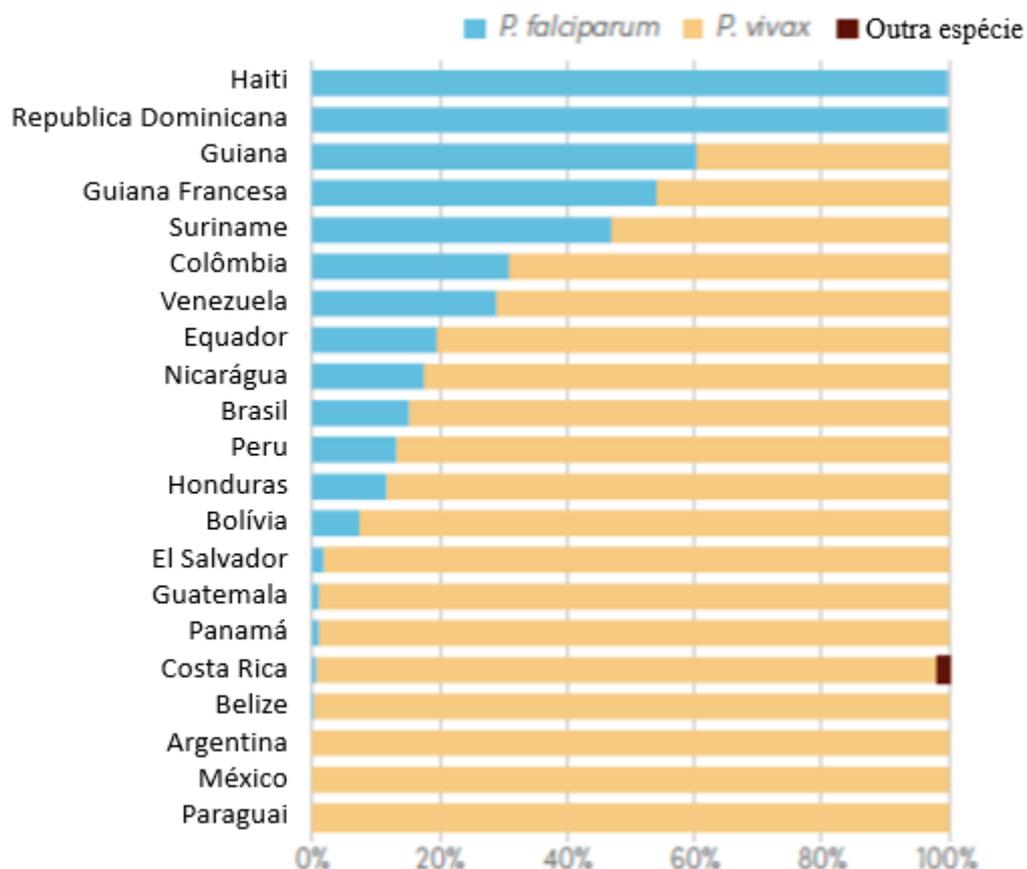


Figura 3: Proporção de casos de malária causados por infecção pelo *P. falciparum* (azul) e *P. vivax* (bege), entre 2010-2014 (adaptado de OMS, 2015).

1.1.3- Ciclo Biológico do *Plasmodium sp*:

Os parasitos do gênero *Plasmodium* possuem um ciclo biológico heteroxeno que inclui um vetor artrópode que transmite o parasito a um hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. A etapa assexuada do ciclo se inicia quando fêmeas do mosquito *Anopheles* infectadas com *Plasmodium* introduzem a forma esporozoíta do parasito, através da saliva, no hospedeiro humano - 1 (Figura 4). Os esporozoítas, uma vez na corrente sanguínea, atingem o fígado, onde infectam os hepatócitos – 2 (Figura 4), se diferenciam à forma esquizonte – 3 (Figura 4), esta última se expande dando origem a uma grande quantidade de merozoítas. Após a ruptura dos hepatócitos, esses merozoítas são liberados na corrente sanguínea, onde passam a infectar eritrócitos circulantes – 4

(Figura 4). Nos eritrócitos – 5 (Figura 4), se diferenciam as fases de trofozoítas imaturos (fase de anel), trofozoítas e esquizontes, replicando-se de forma mitótica a fim de produzir novos merozoítos que irão romper os eritrócitos e liberar novas formas infectivas na corrente sanguínea e reiniciar o ciclo eritrocítico, dando continuidade à fase assexuada do ciclo – 6 (Figura 4). Os sintomas clínicos da doença aparecem durante a fase eritrocítica da infecção. Ainda na circulação, o estágio de trofozoíta imaturo (fase de anel) do parasito pode se diferenciar em gametócitos masculinos e femininos – 7 (Figura 4). Os gametócitos são ingeridos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo, iniciando a fase sexuada do ciclo – 8 (Figura 4), onde se diferenciam a gametas no interior do intestino médio e se fundem formando, macrogametócito – 9 (Figura 4). O macrogametócito se diferencia a oocineto – 10 (Figura 4) e, após, a oocisto – 11 (Figura 4), a partir do qual serão liberadas as formas esporozoítas que migrarão para a glândula salivar do mosquito, para a injeção no hospedeiro humano no próximo repasto sanguíneo – 12 (Figura 4) (Cowman e Crabb, 2006).

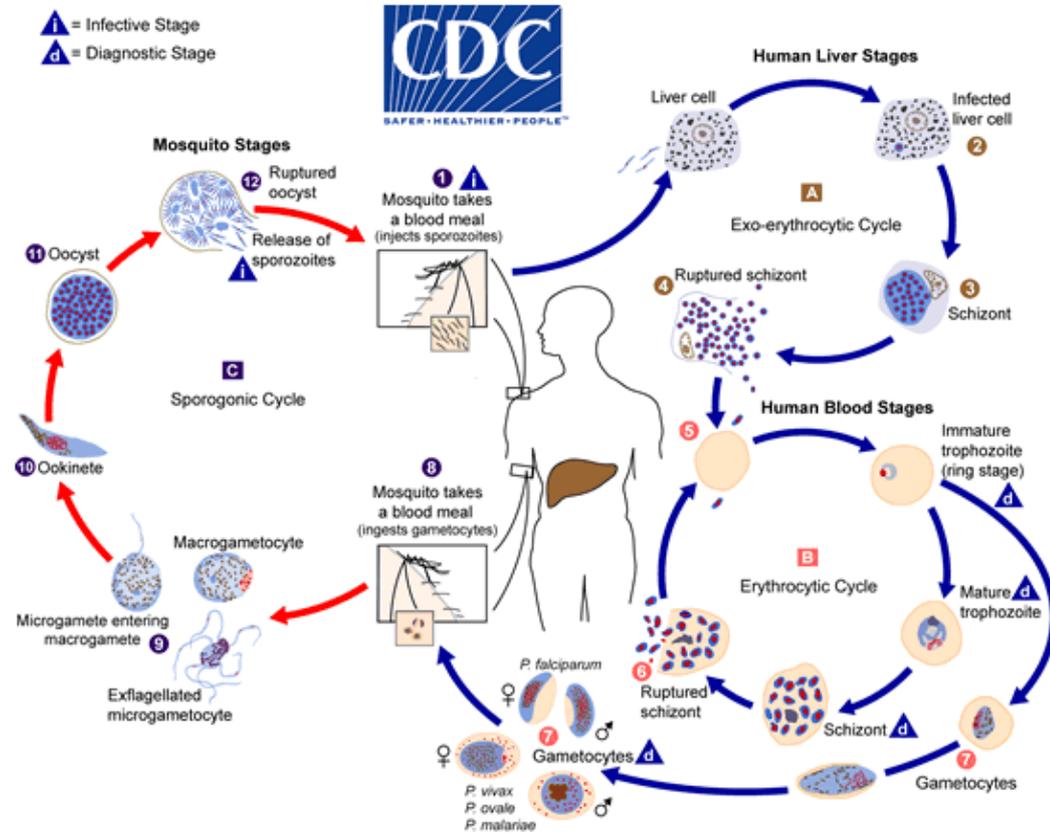


Figura 4: Esquema do ciclo biológico do *Plasmodium* sp. (CDC).

1.1.4 - Malária Cerebral

A malária cerebral é a manifestação clínica mais grave causada pela infecção por *Plasmodium falciparum* e é a principal causa dos quadros de encefalopatia não traumáticas em áreas endêmicas (Idro *et al.*, 2005). Aproximadamente 1% das infecções por *P. falciparum* desenvolvem o quadro de malária cerebral com 90% dos casos registrados em crianças residentes na região da África Sub-Saariana. A taxa de mortalidade varia de 15-20% dos pacientes acometidos, mas 10-20% dos sobreviventes desenvolvem sequelas neurológicas a longo prazo, como por exemplo o dano cognitivo (Birbeck *et al.*, 2010; Storm J., Craig A. G., 2014).

Clinicamente, a malária cerebral é definida pela presença de eritrócitos parasitados por *P. falciparum* em teste de gota espessa, quadro de coma pós convulsões ou pós correção hipoglicêmica e descarte de outro fator causador do coma (OMS, 2000). Outro

evento importante encontrado durante a malária cerebral em crianças é a presença de anormalidades na retina. Dentre as características, incluem-se o clareamento da mácula, edema e hemorragias. Tais eventos podem ser observados por oftalmoscopia e afeta, aproximadamente, 60% de crianças acometidas com malária cerebral (Idro *et al.*, 2005; Joshi *et al.*, 2017).

Gravenor e colaboradores (1998) relataram que a alta carga parasitaria não é um pré-requisito e que é difícil atribuir a malária cerebral a contribuições específicas do parasito, ou do hospedeiro, durante o curso da doença. Porém, vem sendo bastante discutido o papel da citoaderência e da inflamação, com ambos os fatores, provavelmente, atuando de forma significativa na fisiopatologia e na manifestação clínica da doença (Gravenor *et al.*, 1998; Grau e Craig, 2012; Ponsford *et al.*, 2012; Storm J., Craig A. G., 2014).

O sequestro de eritrócitos parasitados na microvasculatura é uma característica da malária cerebral, com autopsias *post mortem* demonstrando a presença de eritrócitos parasitados aderidos, causando o congestionamento em vênulas e capilares. Embora o sequestro também ocorra em pacientes que não morreram por malária cerebral, os níveis de sequestro e a porcentagem de vênulas acometidas são significativamente maiores no tecido cerebral de pacientes com malária cerebral e são correlacionados com a gravidade da doença em adultos e crianças (Ponsford *et al.*, 2012).

Os eritrócitos parasitados aderem ao endotélio através da ligação de proteínas de adesão derivadas do parasito presentes na membrana do eritrócito, como o *Plasmodium falciparum Erythrocyte Membrane Protein 1* – Proteína de membrana eritrocítica 1 expressa pelo *P. falciparum* - (PfEMP1), com receptores de membrana presentes na parede do endotélio, das quais a *Intercellular Adhesion Molecule 1* - molécula de adesão intercelular 1 - (ICAM-1) é uma das mais importantes e está superexpressa nos tecidos

onde ocorre o sequestro (Idro *et al.*, 2010; Avril *et al.*, 2016). A congestão microvascular leva a uma menor oxigenação tecidual (hipóxia), dano endotelial, ruptura da parede dos vasos, culminando no comprometimento da barreira hematoencefálica e formação de hemorragias (Brown *et al.*, 1999; Dorovini-Zis *et al.*, 2011). Também há o desencadeamento de uma série de eventos, incluindo a redução no fluxo sanguíneo cerebral, obstrução vascular, eventos de isquemia e reperfusão, formação de edema cerebral e neuroinflamação (Shikani *et al.*, 2012).

A resposta imune inata se inicia quando o parasito é reconhecido pelo seu epítotope imunogênico (padrão molecular associado ao patógeno – PAMP) pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes na célula hospedeira. O principal PAMP de parasitos do gênero *Plasmodium* é o glicosilfosfatidilinositol (GPI), capaz de se ligar a receptores do tipo Toll 2 (*Toll-like receptor 2* – TLR2) e TLR4, desencadeando a liberação de mediadores inflamatórios, como as citocinas, principalmente por macrófagos e células dendríticas (Erdman *et al.*, 2008; Coban *et al.*, 2009; Apinjoh *et al.*, 2013). Os produtos do metabolismo do parasita, como por exemplo a hemozoína, também podem ser reconhecidos como PAMP por receptores TLR-9, desencadeando uma resposta inflamatória sistêmica, podendo levar à falência de órgãos e a morte (Mishra *et al.*, 2009; Franklin *et al.*, 2011). Esses PAMP's se ligam ao seu receptor em células do sistema imune e levariam a produção de mediadores inflamatórios, como por exemplo, citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), o interferon- γ (IFN- γ), bem como espécies reativas de oxigênio (ROS) e o óxido nítrico (NO) (Nebl *et al.*, 2005; van der Heyde *et al.*, 2006; Erdman *et al.*, 2008; Mishra *et al.*, 2009).

Trabalhos revelaram que a desregulação entre a produção de mediadores pró e anti-inflamatórios participa ativamente da fisiopatologia da malária cerebral. Dentre as

citocinas, o papel do TNF- α é um dos mais abordados, uma vez que possui papel importante na mortalidade do parasito (Richards A L, 1997; Hansen D, 2012). O aumento da expressão do TNF- α induz ao aumento da expressão de moléculas de adesão, como o ICAM-1, levando ao aumento do sequestro de hemácias parasitadas e recrutamento de células do sistema imune, como leucócitos e plaquetas (Shikani *et al.*, 2012). Outra função do TNF- α é induzir a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, através da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que atua como agente vasodilatador e microbicida (Idro *et al.*, 2010; Franklin *et al.*, 2011; Craig *et al.*, 2012).

O papel do óxido nítrico (NO) durante a malária cerebral vêm sendo motivo de grande debate na literatura. O NO é uma molécula sinalizadora que atua em diversas funções, entre elas, possui papel como neurotransmissor e mediador do sistema imune (Dellamea *et al.*, 2014). O óxido nítrico é produzido pela família de enzimas óxido nítrico sintase (NOS), que se apresenta sob três isoformas: NOS endotelial (eNOS), neuronal (nNOS) e a forma induzível (iNOS). Esta última forma, é estimulada de forma importante em células do sistema imune, como os macrófagos (Percário *et al.*, 2012; Ong *et al.*, 2013), em resposta à estímulos inflamatórios, como o TNF- α , o IFN- γ e o IL-1 β , ou PAMPs, como o lipopolissacarídeo (LPS) e o glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Oates *et al.*, 2006).

Idro e colaboradores (2010) relataram que o NO é capaz de transpassar a barreira hematoencefálica e interferir a neurotransmissão, podendo ser o responsável por casos de perda de consciência, ou até mesmo coma. Desta forma, a produção de NO pelas vias neuronal, combinado a outras fontes, como a iNOS proveniente da micróglia, podem ter papel significativo em processos de excitotoxicidade e morte neuronal em diferentes regiões cerebrais (Maiti *et al.*, 2008).

Em resposta a infecções, os mecanismos de defesa do hospedeiro são ativados com o envolvimento de células com propriedades fagocíticas. Estas aumentam a produção de ROS e RNS que possuem papel importante na resposta imune (Oates *et al.*, 2006). Este aumento de ROS e RNS podem levar à uma desregulação entre a produção de espécies reativas e a atividade de enzimas antioxidantes, culminando no estresse oxidativo. O ânion superóxido (O_2^-), que é principalmente sintetizado pela enzima NADPH oxidase, e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem formar moléculas tóxicas, como o peroxinitrito ($ONOO^-$), quando na presença de NO (Percario *et al.*, 2012).

1.1.5 - Modelos Experimentais Murinos de Malária

Elucidar os mecanismos fisiopatológicos acerca da malária cerebral e os mecanismos envolvidos no desenvolvimento da sequela cognitiva são grandes desafios. Como relatado por Idro e colaboradores (2010), avaliar a fisiopatologia da malária é um problema, pois há uma limitação significativa na quantidade de dados fisiopatológicos em humanos. Shikani e colaboradores (2012) relataram que, até a obtenção de dados experimentais, a observação da malária cerebral era limitada a análises *post mortem*. Desta forma, os modelos animais adquiriram uma importância significativa na investigação da patogênese da doença. Embora o modelo murino possua limitações, é o modelo mais utilizado em estudos de malária cerebral *in vivo*. Trabalhos utilizando modelos experimentais relataram diversas similaridades com a infecção em humanos, incluindo o comprometimento da barreira hematoencefálica, a adesão de hemácias parasitadas no endotélio da microvasculatura cerebral, danos a microvasculatura e a presença de sequelas cognitivas, mesmo com o tratamento bem-sucedido com antimaláricos. Essas similaridades suportam a utilização de modelos murinos na tentativa de elucidar os mecanismos envolvidos na fisiopatologia da malária cerebral, bem como os mecanismos envolvidos na formação do dano cognitivo associado à malária cerebral (Reis *et al.*, 2010;

Shikani *et al.*, 2012; Reis *et al.*, 2012). A tabela 1 demonstra os modelos experimentais murinos.

Espécie de <i>Plasmodium</i>	Cepa	Linhagem murina susceptível a infecção	Características
<i>P. berghei</i>	NK65, ANKA	C57Black 6	Sintomas clínicos da malária
<i>P. yoelii</i>	17x	Balb/c	Modelo limitado para desenvolvimento de vacinas
<i>P. chabaudi</i>	AS	A/J, DBA/2,	Susceptível a infecção de eritrócitos
		C57Black 6	Resistente a infecção de eritrócitos
<i>P. vinckei</i>	vinckei	Balb/c	Infecção letal

Tabela 1: Modelos murinos de infecção com *Plasmodium*. (Matuschewski K, 2013).

O modelo mais utilizado na literatura e o mais bem aceito na reprodução de características mais graves associado à malária, como a malária cerebral, é a infecção de camundongos da linhagem C57Black/6 com o *Plasmodium berghei* ANKA (PbA). Este modelo experimental é caracterizado pela formação de edema cerebral, comprometimento da barreira hematoencefálica, redução do fluxo sanguíneo cerebral, produção de mediadores inflamatórios, bem como espécies reativas de oxigênio e

nitrogênio, e a formação de dano cognitivo a longo prazo (Lamb *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010; Ong *et al.*, 2013).

1.2 – Neuroinflamação

As funções do sistema nervoso central (SNC) são dependentes da atividade dos neurônios, que estão dispostos em circuitos neuronais precisos que interagem entre si e interconectam diferentes regiões cerebrais com funções especializadas. Logo, lesões no tecido cerebral podem levar a dano de circuitos neurais, gerando sequelas neurocognitivas a curto ou longo prazo, dependendo da gravidade da lesão (Mattson e Magnus, 2006).

Os mecanismos que levam a disfunções neurocognitivas ainda não foram estabelecidos, entretanto, a neuroinflamação parece possuir um papel fundamental, o que sugere o envolvimento de células do endotélio, da glia e do sistema imune. A ativação endotelial e das células da microglia podem ser a ponte conectando a neuroinflamação e a toxicidade neuronal que irá deflagrar as possíveis sequelas (Dallerac *et al.*, 2013; Abbott *et al.*, 2006).

A neuroinflamação descreve os eventos envolvidos no processo inflamatório em resposta a patógenos, infecções ou lesão ao tecido cerebral (Banjara e Gosh, 2017).

Os astrócitos e as células da micróglia expressam receptores especializados em reconhecimento de padrões (PRRs) que são capazes de disparar cascatas inflamatórias. Esses PRRs reconhecem PAMPs, bem como também reconhecem moléculas derivadas do próprio hospedeiro, denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (Banjara e Gosh, 2017). Em situações normais, a neuroinflamação é a resposta celular e molecular que objetiva a remoção de patógenos, restos celulares e células danificadas após uma infecção ou uma situação de injúria tecidual e, após a resolução da inflamação, auxilia a regeneração do tecido para o retorno ao quadro de homeostasia (Heneka *et al.*, 2014; Ransohoff R M, 2016).

A neuroinflamação é caracterizada pelo aumento nos níveis de ROS e RNS, citocinas e quimiocinas inflamatórias, como o IL-1, TNF- α e o IFN- γ , bem como a ativação de células da glia, como astrócitos e a microglia e, em casos mais graves, o comprometimento da barreira hematoencefálica (Streit *et al.*, 1999; Lossinsky e Shivers, 2004). A exacerbação da resposta inflamatória causa danos aos neurônios saudáveis (Banjara e Gosh, 2017).

A malária cerebral, bem como a malária cerebral experimental, está diretamente relacionada a presença da neuroinflamação, distúrbios na homeostasia e alterações na microcirculação, como os eventos de isquemia e reperfusão. A neuroinflamação na malária cerebral envolve mediadores derivados do metabolismo do parasito, como a hemozoína, ROS, RNS e o PfEMP-1, bem como mediadores produzidos pelo hospedeiro, como o TNF- α e a IL-1 β . O estresse oxidativo, o comprometimento da barreira hematoencefálica e a neuroinflamação são eventos importantes no desenvolvimento da malária cerebral e com importantes consequências fisiopatológicas (Reis *et al.*, 2010).

A desregulação e perpetuação da neuroinflamação vêm sendo identificadas como processos importantes na deflagração e progressão de diversas doenças de caráter neurodegenerativo (Choi *et al.*, 2007). Dentre os fatores contribuintes podemos citar o aumento na ativação de células da glia, as quais contribuem para disfunção, lesão e morte neuronal (Streit, 2004).

Durante a malária cerebral, a ligação de PAMPS aos receptores TLR desencadeia uma resposta inflamatória sistêmica, que resulta em falência múltipla de órgãos – quadro de sepse associada à infecção – e morte (Mackintosh *et al.*, 2004). O glicosilfosfatidilinositol (GPI) estimula a síntese de citocinas pelas células macrofágicas pela ativação de receptores do tipo TLR-2 e, também, TLR-4. Além disso, a ativação do receptor TLR-9 por PAMPS, é associado à resposta inflamatória em resposta à hemozoína

resultante do metabolismo do parasito (Erdman *et al.*, 2008). Como revisado por van der Heyde (2006), esta ligação do GPI ao seu respectivo receptor TLR ativa a secreção de IL-1, IL-6, do fator estimulador de crescimento de colônia de macrófagos (M-CSF), TNF- α , linfotóxina, ROS e RNS. Os altos níveis de TNF- α levariam ao aumento da expressão de moléculas de adesão, como o ICAM-1 e o VCAM-1, que medeia a adesão de eritrócitos parasitados – via o PfEMP-1 – e de células do sistema imune ao endotélio da microvasculatura cerebral. Além dos eventos de adesão de eritrócitos à microcirculação, recrutamento de células do sistema imune e aumento nos níveis de mediadores inflamatórios, também já foram datados os eventos de comprometimento da barreira hematoencefálica, formação de edema e ativação de células da glia – principalmente astrócitos e da microglia –. A ativação do endotélio e das células da glia podem ser a ponte conectando a neuroinflamação e a toxicidade neuronal durante a malária cerebral (Abbott *et al.*, 2006; Dallerac *et al.*, 2013).

1.3 – Microglia

As células da glia representam todos os tipos celulares que não são neurônios no SNC. As células foram denominadas gliais porque o termo “glia” é derivado do grego e significa “cola”, sugerindo o papel de suporte de células não-neuronais aos neurônios. As células da glia representam mais de 90% do cérebro humano e consistem de duas populações principais: a macroglia (astrócitos e oligodendrócitos) e a microglia (Greter e Merad., 2013).

Pío del Rio-Hortega (1932) foi o pioneiro a distinguir a microglia da macroglia e a sugerir a origem mesodermal dessas células e, de forma interessante, este estudo ainda possui bastante relevância e, hoje, é bem aceito que a microglia é derivada de precursores mielóides, como os macrófagos (Greter M, Merad M, 2012).

A microglia é considerada um dos principais sistemas de defesa do sistema nervoso central e se distribui por toda a extensão tecidual, chegando a representar, aproximadamente, entre 10-16% da população celular cerebral total (Norden e Godbout, 2013). Embora haja semelhanças entre as funções de macrófagos e da micróglia, esta última possui particularidades, como por exemplo sua morfologia celular. Em homeostasia, as células da micróglia se apresentam com bastantes ramificações e muitos prolongamentos (Figura 5). Em homeostase, a micróglia possui funções importantes, como o monitoramento de sinapses inativas, remoção de corpos apoptóticos e restos celulares, e a poda sináptica (*synaptic pruning*). Em condições adversas, como injúrias, danos teciduais e infecções, a microglia se torna hipertrófica, apresenta aumento do corpo celular, redução da quantidade de prolongamentos e aumento nos níveis de moléculas de superfície, como o *cluster of differentiation* (CD14), o complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e receptores de quimiocinas e citocinas (Streit W J, 2006). Em um estado de ativação máximo, a microglia assume uma morfologia amebóide, com prolongamentos grossos, menos numerosos e se tornam altamente reativas com uma elevada capacidade fagocítica (Figura 5) (Streit W J, 2006, Block M L, Zecca L, Hong J, 2007; Wake *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2010; Paolicelli *et al.*, 2011).

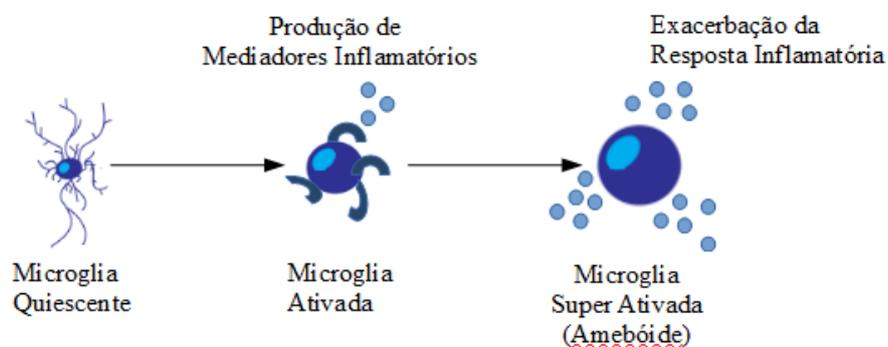


Figura 5: Esquema de ativação da micróglia. A micróglia em condições de homeostase possui morfologia altamente ramificada. Em condições de dano tecidual, a micróglia muda sua morfologia apresentando aumento do corpo celular, redução nos

prolongamentos e regula positivamente a produção de mediadores inflamatórios (adaptado de Perry *et al.*, 2007).

Outra característica importante é a mobilidade das células da micróglia, que permitem às mesmas detectar, migrar ao sítio inflamatório e responder rapidamente aos estímulos inflamatórios (Davalos *et al.*, 2005). As respostas das células da micróglia a estímulos inflamatórios consistem em: migração ao local lesionado; processamento e apresentação de antígenos; síntese de mediadores inflamatórios; e fagocitose (Dheen *et al.*, 2007; Farfara *et al.*, 2008). As células da micróglia são os fagócitos profissionais do SNC. Neste aspecto, a capacidade da micróglia em retirar neurônios mortos, ou em processo de morte celular, é benéfico pois, em parte, reduzem a inflamação. Entretanto, também são capazes de fagocitar neurônios vivos e progenitores neuronais. Desta forma, a regulação da atividade fagocítica microglial é importante para a manutenção tecidual e a sua desregulação pode levar a efeitos deletérios (Brown e Neher, 2014).

A micróglia constantemente faz um trabalho de reconhecimento sobre a superfície celular de neurônios. Quando se é detectado a exposição de sinais “*eat-me*” (como o fosfolípido fosfatidilserina), rapidamente o neurônio, ou restos celulares, é fagocitado. Esses sinais podem ser reconhecidos por opsoninas, que são proteínas solúveis extracelulares que facilitam a fagocitose pela ligação aos sinais “*eat me*” das células-alvo, e com os receptores fagocíticos em fagócitos (Brown e Neher, 2014). A fagocitose realizada pelas células da micróglia está diretamente associada à ligação de quimiocinas aos seus receptores específicos, como por exemplo a ligação da CX_3CL_1 (Fractalkina) ao seu receptor CX_3CR_1 (Paolicelli *et al.*, 2014). Já foi demonstrado que a fractalkina é produzida por células endoteliais, moduladas pela atividade de citocinas, como a IL-1, e medeiam a migração de monócitos e células T, o que sugere a sua relevância em eventos inflamatórios no tecido cerebral (Maciejewski-Lenoir *et al.*, 1999; Paolicelli *et al.*, 2014).

Em eventos iniciais da resposta neuroinflamatória ocorre a modulação nos níveis de fatores solúveis por neurônios danificados, culminando no recrutamento de células da micróglia. Entre estes fatores solúveis, a redução nos níveis de fractalkina modula a atividade microglial (Lauro *et al.*, 2015). A redução na ligação da fractalkina, presente em neurônios, com o receptor, expresso pelas células da micróglia, desencadeiam rápidas mudanças nas atividades microgliais, como por exemplo a mobilização de cálcio intracelular, iniciando cascatas de sinalização relacionadas com o rearranjo do citoesqueleto e migração celular (Paolicelli *et al.*, 2014).

A ativação microglial leva a ativação de diversas vias associadas à neuroinflamação, como a ativação de *c-Jun N-terminal kinase* (JNK), bem como a ativação do fator nuclear kappa B (NF-kB) (Sheridan e Murphy, 2013).

A ativação microglial vêm sendo associada a patologias e a progressão de diversas doenças de caráter neuroinflamatório, como por exemplo a esclerose múltipla, a esclerose lateral amiotrófica, Parkinson e Alzheimer. O dano neuronal progressivo após o quadro clínico de acidente vascular cerebral (AVC) também pode vir a ativar as células da micróglia. Em condições inflamatórias, a micróglia, pode induzir a neurotoxicidade por diversos mecanismos, incluindo a produção de NO pela forma induzível do óxido nítrico sintase (iNOS), levando, diretamente, à neurotoxicidade (Block *et al.*, 2007).

A exacerbação da neuroinflamação é frequentemente vista com efeito deletério às funções neuronais. Consequentemente, o sistema imune é um importante alvo terapêutico, mesmo em doenças que acometem o SNC. A proximidade da patologia e o potente arsenal de moléculas citotóxicas fazem da micróglia uma importante colaboradora na neuroinflamação. As perturbações nas funções homeostáticas da micróglia levam a anormalidades nos circuitos neuronais, que podem vir a contribuir para a exacerbação da resposta inflamatória no SNC (Aguzzi *et al.*, 2013).

Embora tenha sido discutido o papel da micróglia com efeitos danosos aos neurônios por conta da sua ativação pró-inflamatória, evidências tem demonstrado os benefícios do perfil neuroprotetor associado a micróglia. Embora a superativação em um perfil pró-inflamatório da microglia seja deletéria, a microglia, também está envolvida na manutenção, reparo e, possivelmente, proteção (Block, Zecca e Hong, 2007). A polarização da microglia, simplificada, é categorizada nos perfis de ativação macrofágica M1 e M2. Apesar da aproximação com os perfis de macrófagos, a microglia pode ser polarizada em um estágio intermediário entre neuroinflamatório e o neuroprotetor. A microglia M1 expressa moléculas pró-inflamatórias como o TNF- α , o IL-1 β , IFN- γ e NO. Diferentemente, a microglia M2 expressa moléculas como o IL-4, arginase-1, IL-10 e mostra efeitos neuroprotetores (Ponomarev *et al.*, 2007; Liao *et al.*, 2012; Kobayashi *et al.*, 2013).

A cerca de dados envolvendo a ativação de células da microglia durante a malária cerebral, Capuccini e colaboradores (2016) relataram que o perfil do transcriptoma de células da microglia revelaram marcadores de ativação celular e de resposta imune durante a malária cerebral experimental. De acordo com Szklarczyk e colaboradores (2007), os eventos que ocorrem na vasculatura cerebral levam a ativação de células da glia pela difusão de diversos fatores como a hipóxia, ativação de células endoteliais e alterações na permeabilidade da barreira hematoencefálica. Além disso, Szklarczyk e colaboradores (2007), relataram dados obtidos por histologia que sugerem que o desenvolvimento da malária cerebral envolve vênulas cerebrais com a presença de eritrócitos parasitados, presença de microhemorragias no tecido cerebral e presença de isquemia. Posteriormente, lesões conhecidas como granuloma de “Durck” são observadas. O granuloma de “Durck” é caracterizado por ser um agregado de astrócitos e de células da microglia reativas.

1.4 – Memória

A memória é o processo que envolve a aquisição, a formação, a conservação e a evocação de informações. A aquisição é também conhecida por aprendizagem e a evocação, por recordação, lembrança ou recuperação. O processo de aprendizado pode ser descrito como os mecanismos pelos quais novas informações são adquiridas e a memória como o mecanismo pelo qual o conhecimento é retido (Izquierdo e Pereira, 1989; Lynch, 2004). É conveniente categorizar a memória como explícita, que é definida pelo envolvimento da evocação consciente de informações acerca de pessoas, lugares e objetos, ou implícita, que é caracterizada pela evocação inconsciente em resposta a estímulos. A memória explícita depende da integridade do lobo temporal, bem como do hipocampo e do córtex entorrinal. Em contrapartida, as memórias implícitas incluem simples associações de memória, como a memória condicionada e não-condicionada, e depende de estruturas como o cerebelo e os gânglios basais. Embora diversas estruturas cerebrais tenham participação na consolidação de formas de aprendizados/memórias, o hipocampo é reconhecido por realizar um papel fundamental na formação de memória (Squire L R, 1992; Lynch M A, 2004).

O hipocampo consiste de duas finas camadas de neurônios, dobradas uma sobreposta a outra. As principais estruturas do hipocampo estudadas na literatura acerca da formação de memória são as regiões do CA1, CA3 e o giro denteado (Figura 6).

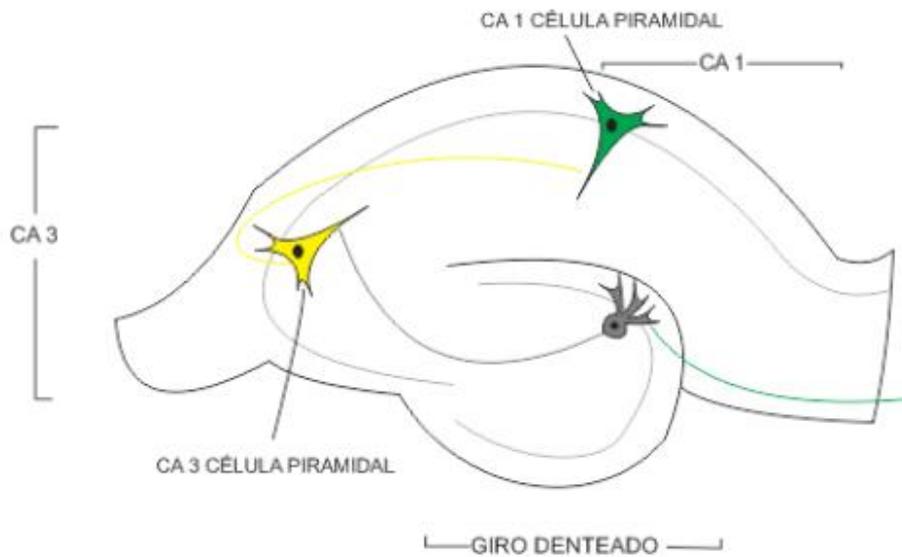


Figura 6: Principais regiões hipocampais envolvidas no processo de formação de memória. Estrutura interna do hipocampo e suas principais conexões intrínsecas. Diversos axônios provenientes do córtex entorrinal mantêm conexões com o hipocampo. As fibras oriundas do córtex entorrinal fazem sinapse com as células do giro denteado, que projeta axônios à região CA3 que, por sua vez, emite axônios à região CA1. Os axônios de CA1, após, conecta-se ao giro denteado (Izquierdo e Medina, 1997).

A memória segue, basicamente, etapas que envolvem: a experimentação; a codificação; a consolidação; e a fixação. A etapa de experimentação envolve a vivência a um evento, ou estímulo, específico. Após, algumas características desse evento são codificadas em uma série de processos que posteriormente levam ao processo de consolidação das informações. A consolidação da memória demanda uma quantidade de tempo significativa e é importante na determinação na seleção de quais informações serão preservadas e a durabilidade da informação fixada como memória. Após essas etapas, a memória consolidada pode ser evocada pelo indivíduo em resposta a eventos semelhantes, ou idênticos, ao primeiro evento vivenciado (Nadel *et al.*, 2012). As

alterações possíveis que podem ocorrer a memória previamente fixada podem influenciar desde a sua evocação, o fortalecimento, ou até mesmo a sua extinção (Nadel *et al.*, 2012; Hupbach *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2003). As memórias podem acumular ou perder informações durante períodos prolongados. No entanto, ao longo de dias, meses, ou até mesmo anos, existem oscilações na taxa de extinção, incorporação de novas memórias de curto prazo, ou memórias de longo prazo (Izquierdo *et al.*, 2006).

A codificação, armazenamento e evocação da memória, são resultados da atividade coordenada e interação de milhões de neurônios e sinapses. As sinapses são consideradas excepcionalmente plásticas em sua composição, função e arquitetura. A literatura relata que as sinapses são fortemente influenciadas pelo tráfego de impulsos, pela homeostase e efeitos modulatórios de sinais vizinhos provenientes de células neuronais e gliais. A plasticidade sináptica é elementar nos processos de aprendizado, desenvolvimento de memória, remodelação e homeostase de circuitos neurais. Na etapa de aprendizado, há modificações nas conexões sinápticas, na comunicação e, subsequentemente, as modificações se tornam estáveis a fim de preservar as características obtidas durante o processo de formação de memória. Essas modificações podem gerar memórias de curto prazo, ou memórias de longo prazo (Amtul e Atta-ur-Rahman, 2015; Mozzachiodi e Byrne, 2010).

A memória de curta duração estende-se desde os primeiros segundos seguintes à etapa de aprendizado, até 3-6 horas. Os mecanismos envolvidos na formação da memória de curta duração envolvem principalmente eventos bioquímicos. O início ocorre no hipocampo e nas estruturas adjacentes, como o córtex entorrinal e a amígdala basolateral, via ativação de receptores glutamatérgicos do tipo canais iônicos, α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico (AMPA), N-metil-D-aspartato (NMDA) e metabotrópicos (ligados a proteína G). Durante a primeira hora, é necessário a ativação de enzimas α e/ou

β -II da proteína quinase C (PKC). Nos 90 minutos iniciais é necessário a ativação da proteína quinase A (PKA) no hipocampo, enzima essa que também é utilizada durante o processo de formação da memória de longa duração. Logo após a etapa de aprendizado, a memória de curta duração requer a ativação da via de MAP quinase (MAPK) no hipocampo. A formação da memória de curta duração é inibida pela ativação de receptores GABAérgicos. (McGaugh, 2000; Izquierdo *et al.*, 1999).

A consolidação da memória e a formação da memória de longa duração está relacionada com potenciais de longa duração (LTP) que são o aumento persistente da resposta neuronal à estimulação axonal, podendo ser um somente ou vários axônios que realizam sinapses com os neurônios. O aumento da estimulação e das respostas pós-sinápticas por horas, dias, ou mesmo semanas tem papel importante da LTP na formação, consolidação e armazenamento de memórias de longa duração (Izquierdo *et al.*, 2008). Os eventos bioquímicos que circundam a LTP são bastante semelhantes a formação de memórias de curta duração, pois compartilham a mesma cascata iniciadora, mas diferindo no envolvimento de 4 cascatas de sinalização distintas com 4 proteínas quinases diferentes: PKG, PKC, PKA e CaMKII, seguido de mudanças em subunidades dos receptores glutamatérgicos e aumento na expressão de fatores de transcrição. A modulação dos eventos bioquímicos durante a LTP é mediada, localmente, por sinapses em receptores GABAérgicos, colinérgicos e noradrenérgicos. Posteriormente, a modulação depende de receptores β -adrenérgicos, 5HT1A e dopamina D1 no hipocampo. Evidências relatam que durante a LTP, a atividade hipocampal mediada por receptores do tipo AMPA persistem por, aproximadamente, 3 horas a fim de consolidar a memória. A atividade hipocampal é transmitida a outras regiões e estruturas, pelo recrutamento de cascatas de sinalização via receptores dopaminérgicos, adrenérgicos e serotoninérgicos, bem como, o córtex entorrinal e o córtex parietal. O córtex parietal e entorrinal participam

da etapa de consolidação da memória minutos após a cadeia de eventos hipocampais é iniciada, em ambos os casos via receptor NMDA. A cadeia de eventos no hipocampo, acompanhada de sua plasticidade sináptica, é importante para a formação e consolidação da memória. Bem como, a cadeia de eventos para formação da memória de longa duração está conectada com LTP (Izquierdo e Medina, 1997; Medina *et al.*, 2008; Amtul e Attatur-Rahman, 2015).

O fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) é um membro da família das neurotrofinas e é o fator de crescimento mais produzido no tecido cerebral, especialmente no hipocampo (Bramham e Messaoudi, 2005; Comim *et al.*, 2012). O BDNF é sintetizado, armazenado e liberado de neurônios glutamatérgicos (Lessmann *et al.*, 2003).

O BDNF possui papel importante durante o processo de aprendizado e formação de memória. Dentre as suas funções, o BDNF possui papel crítico na regulação da sobrevivência e na diferenciação de populações neuronais no SNC (Binder e Scharfman 2004), além disso, é um importante fator na regulação de diferentes circuitos neuronais como por exemplo, no cérebro adulto, o BDNF tem papel importante na transmissão de sinapses excitatórias e na plasticidade (Tyler *et al.*, 2002).

O BDNF se liga preferencialmente à receptores do tipo tirosina quinase (Trk) B e, no hipocampo, ambos são expressos nos neurônios principais e alguns interneurônios, resultando na sinalização interna hipocampal (Bramham e Messaoudi, 2005). Ainda no hipocampo, evidências sugerem que o BDNF facilita as fases iniciais e finais no processo de formação da LTP (Lu e Chow, 1999). A ligação do BDNF ao receptor TrkB leva a autofosforilação do resíduo de tirosina no domínio intracelular, levando a ativação de uma, ou mais, das 3 principais vias de sinalização, como a via MAP quinase (MAPK), Fosfatidilinositol-3 quinase (PI3K) e a fosfolipase C γ (PLC- γ) (Nagappan e Lu, 2005).

Os níveis homeostáticos de BDNF no tecido cerebral são essenciais para a manutenção das funções de aprendizagem e formação de memória, por um processo denominado consolidação sináptica. Em adição, há trabalhos que relatam reduções nos níveis de BDNF em doenças neurodegenerativas (Weickert *et al.*, 2003; Allen e Dawbarn, 2006).

O BDNF é um fator crucial na plasticidade neuronal, pois são abundantes em regiões importantes, onde participam dos eventos de crescimento e remodelamento axonal, e dendritico. Eles são responsáveis pela produção de neurotransmissores e pela formação e funcionamento de sinapses (Bramham e Massaoudi, 2005; Lu *et al.*, 2005). A exacerbação da neuroinflamação, que ocorre durante processos naturais, como no envelhecimento, bem como em resposta a estímulos inflamatórios, podem reduzir significativamente a quantidade de BDNF necessária aos processos de plasticidade relacionada a formação de memória (Patterson, 2015) e diversos estudos demonstraram que a inflamação afeta a expressão do BDNF no cérebro (Guan e Fang, 2006; Schnydrig *et al.*, 2007).

1.5 – Dano Cognitivo na Malária Cerebral

A cada ano, as doenças infecciosas matam aproximadamente nove milhões de pessoas, na maioria crianças até cinco anos (OMS, 2012). Além disso, os pacientes que sobrevivem às doenças infecciosas podem desenvolver debilidades. Diversos trabalhos vêm relatando que pacientes sobreviventes de doenças inflamatórias sistêmicas graves com acometimento cerebral, como a encefalopatia associada a sepse, AIDS e a malária cerebral, apresentam sequelas físicas e neurológicas, podendo ser reversíveis ou não (Carter *et al.*, 2006; Morandi e Jackson, 2011; del Palacio *et al.*, 2012).

As sequelas neurológicas associadas aos casos mais graves de malária têm um papel potencialmente negativo no desenvolvimento das crianças sobreviventes, podendo causar declínio cognitivo a longo prazo e consequências socioeconômicas no decorrer do desenvolvimento do indivíduo (Carter *et al.*, 2005; Boivin *et al.*, 2007; John *et al.*, 2008).

O dano cognitivo associado à malária cerebral é frequente em crianças sobreviventes do quadro clínico de malária grave e, como relatado por Boivin e colaboradores (2007), pode persistir por anos, sendo potencialmente irreversível. O déficit de atenção, acompanhado à deficiência na linguagem e fala – dificuldades com vocabulário, esquecimento de palavras e fonologia – são comuns em crianças com dano cognitivo após o quadro clínico de malária cerebral. De acordo com Idro e colaboradores (2010), está claro que muitas crianças sobreviventes desenvolveram e sustentaram algum tipo de deficiência neurológica a longo prazo. Onze por cento desenvolveram deficiências graves, como perda de visão, ataxia e hipotonia. Entre as sequelas neurológicas graves, vinte e cinco por cento dos pacientes sobreviventes desenvolvem sequelas a longo prazo acometendo funções cognitivas, motoras e alterações no comportamento (Brewster *et al.*, 1990; Newton *et al.*, 1998; Boivin *et al.*, 2007; John *et al.*, 2008; Idro *et al.*, 2010).

Os mecanismos que levam ao desenvolvimento do dano cognitivo não foram completamente elucidados e estratégias terapêuticas que visem a prevenção e tratamento dessas sequelas ainda não estão à disposição dos pacientes. A neuroinflamação parece desempenhar um papel fundamental na deflagração da sequela cognitiva, sugerindo o envolvimento de diversos tipos celulares, como células endoteliais, células do sistema imune, astrócitos e microglia. A ativação das células endoteliais, acompanhado da ativação de células gliais podem ser a ponte conectando a inflamação tecidual e a toxicidade neuronal que, posteriormente, levarão à disfunção cognitiva (Hora *et al.*, 2016).

Um problema fundamental na avaliação dos mecanismos que levam a deflagração do dano cognitivo após o quadro clínico de malária cerebral é a relativa insuficiência de amostras e dados uma vez que a experimentação em humanos seria invasiva e insegura, embora o estudo em amostras de tecidos cerebrais *post mortem* tenham obtido papel importante na obtenção dos primeiros dados (Idro *et al.*, 2010). Desta forma, os estudos em modelos experimentais são importantes na investigação dos mecanismos fisiopatológicos da malária cerebral. Os modelos animais reproduzem diversas características da doença em humanos, como por exemplo a infecção de camundongos C57/Black 6 com o *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) que é capaz de desenvolver danos neurológicos e comportamentais, similares à infecção de humanos com o *Plasmodium falciparum*, incluindo fatores como ataxia, microhemorragias, convulsões e coma (Matuschewski, 2013). Além disso, a partir de dados obtidos pela contagem de parasitemia e por alterações comportamentais, definidas pelo protocolo *SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College, Royal London Hospital, phenotype assessment* (SHIRPA), é possível inferir preditivamente se houve o desenvolvimento da malária cerebral em camundongos C57Black/6 infectados com PbA (Martins *et al.*, 2010).

Diversos trabalhos utilizando modelos experimentais vêm documentando alterações metabólicas, aumento nos níveis de mediadores inflamatórios, como citocinas e quimiocinas, aumento de ROS, bem como foram capazes de reproduzir a seqüela cognitiva a longo prazo (Lamb *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012; Sheikh *et al.*, 2014). Reis e colaboradores (2010) relataram que após o quadro clínico de malária cerebral, camundongos C57/Black 6 infectados com PbA desenvolviam dano cognitivo, sendo determinado através de experimentos que determinavam a formação de memória aversiva – ensaio de esquiva inibitória – e formação de memória espacial – ensaios de reconhecimento de objeto e campo-aberto –. É de suma relevância elucidar os

mecanismos envolvidos na deflagração da malária cerebral e do dano cognitivo associado subsequente, a fim de enriquecer a literatura, propor novos alvos terapêuticos e desenvolver novas estratégias de tratamento (Stoltenburg-Didinger *et al.*, 1993; Medana *et al.*, 1997; Desruisseaux *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2012).

1.6 – Minociclina

A minociclina é um antibiótico semissintético pertencente ao grupo das tetraciclinas primeiramente sintetizado em 1967 (Aronson, 1980). Em comparação com outras tetraciclinas, a minociclina possui uma melhor biodisponibilidade e tem a propriedade de transpassar a barreira hematoencefálica, esta última característica se dá por seu tamanho reduzido e sua alta capacidade lipofílica (Jordan *et al.*, 2007; Chaoyun *et al.*, 2013). A minociclina vêm sendo usada no tratamento de diversas infecções, como por exemplo infecções respiratórias. Ela é efetiva no combate a bactérias gram-positivas e gram-negativas (Garrido-Mesa *et al.*, 2013).

Além da sua atividade antimicrobiana, podem ser observados efeitos anti-inflamatórios em doenças de caráter neurodegenerativo e outros efeitos benéficos em lesões cerebrais. Trabalhos vêm relatando efeitos neuroprotetores em modelos experimentais de doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer, o Parkinson, a doença de Huntington, assim como em modelo experimental de acidente vascular encefálico (Blum *et al.*, 2004; Noble *et al.*, 2009; Chaoyun *et al.*, 2013).

Como descrito anteriormente, a neuroinflamação é importante em fisiopatologias que culminam com a neurodegeneração. Atualmente, é bem aceito que mediadores inflamatórios, como as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 que são produzidas por células da microglia, astrócitos, neutrófilos e macrófagos, podem levar à efeitos deletérios aos neurônios pela exacerbação da resposta inflamatória (Stirling *et al.*, 2005). Baseando-se nesta última informação, o tratamento com minociclina exerce efeito anti-inflamatório,

suprimindo a proliferação e a ativação microglial, bem como na redução dos níveis de mediadores inflamatórios (Kim e Suh *et al.*, 2009; Plane *et al.*, 2010; Chaoyun *et al.*, 2013).

Kobayashi e colaboradores (2013) demonstraram que a administração de minociclina inibiu a ativação da micróglia em um perfil pró-inflamatório em modelo animal de esclerose lateral amiotrófica, reduzindo os níveis de importantes mediadores inflamatórios, como o TNF- α , IFN- γ e IL-1 β , bem como observaram o mesmo fenômeno *in vitro* em células de micróglia estimuladas com LPS. Tikka e colaboradores (2001) relataram que a minociclina tem efeitos neuroprotetores *in vitro* em coculturas de micróglia com neurônio, pela inibição da ativação e proliferação de células da micróglia.

Desta forma, este trabalho avaliou os efeitos da minociclina na ativação de células da micróglia e nos eventos neuroinflamatórios associados à malária cerebral. Além disso, também foi avaliado o efeito no tratamento na prevenção ao dano cognitivo decorrente da infecção pelo *Plasmodium berghei* ANKA.

2- Objetivos:

2.1 – Objetivo Geral:

Avaliar o papel da minociclina nos eventos que deflagram o dano cognitivo associado à malária cerebral.

2.2- Objetivos Específicos:

Observar o efeito do tratamento com minociclina:

- Na progressão da malária grave;
- Na ativação da microglia;
- Nos eventos celulares e moleculares associados ao desenvolvimento da malária cerebral;
- Na possível prevenção da formação do dano cognitivo.

3- Material e Métodos

3.1 - Modelo Experimental

Para o modelo de malária cerebral experimental (MCE) foram utilizados camundongos da linhagem C57Black/6 obtidos do Biotério Central da Fiocruz (licença CEUA L25/15) mantidos em ciclo claro/escuro, 12/12 horas. A cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) foi obtida de amostras de sangue de camundongo, infectado com PbA, congelada e passada a animais doadores (200 µL sangue/animal, via intraperitoneal - i.p.). Para os experimentos, o animal doador que possuísse, aproximadamente, 10% de parasitemia no quinto dia após a infecção, tinha o sangue coletado e utilizado para infectar os grupos experimentais com 200 µL de sangue diluído em PBS contendo 10⁶ eritrócitos parasitados, injetados intraperitonealmente. Os animais dos grupos controles (RBC) foram inoculados com hemácias não parasitadas.

3.2 – Tratamentos

Os animais referentes ao grupo tratado (RBC+Mino e PbA+Mino) receberam tratamento com o fármaco Minociclina (50 mg/kg) (Sigma Aldrich) diluído em PBS e administrado do terceiro ao sexto dia após a infecção, via oral (Li *et al.*, 2013). Os animais destinados aos experimentos de comportamento receberam tratamento com o antimalárico Cloroquina (25 mg/kg) (Sigma Aldrich), diluído em PBS e administrado do sexto ao décimo segundo dia após a infecção, via oral.

3.3 - Avaliação do Escore Clínico

Nos dias 3 e 6 após a infecção com PbA, os camundongos foram avaliados de acordo com 18 sintomas clínicos: piloereção; corpo arqueado; andar vacilante; convulsões; paralisia de pata; coma; taxa de respiração alterada; cor da pele; alteração no

batimento cardíaco; lacrimação; fechamento de pálpebras; ausência de força nos membros superiores; perda de tônus dos membros, abdominal e corporal; alteração de temperatura corporal; ausência de interesse pelo ambiente; e imobilidade ao toque. Na presença do sintoma é dado a pontuação 1 e na ausência, 0. Os animais que obtiverem somatório igual, ou maior, a 3 são marcados como positivos para malária cerebral (Reis *et al.*, 2012).

3.4 - Desenho Experimental

Os animais foram divididos em 2 grupos experimentais: Animais infectados com PbA; e animais controles não-infectados (RBC). Ao terceiro dia após a infecção dos grupos experimentais, os grupos iniciais foram novamente divididos em: Animais infectados com PbA; Animais infectados com PbA tratados com minociclina (PbA+Mino); Animais controles não-infectados (RBC); e Animais controles não-infectados tratados com minociclina (RBC+Mino). Para os experimentos de análise comportamental, todos os grupos receberam tratamento com a droga antimalárica cloroquina do 6º ao 12º dia pós-infecção. A avaliação cognitiva foi realizada no 15º e 16º dias pós-infecção. Em outro bloco de experimentos, os animais foram levados a óbito no 6º dia pós-infecção para extração de amostras de tecido cerebral. A partir dessas amostras de 6º dia foram feitos cortes histológicos para marcação por imunohistoquímica, e análises bioquímicas e moleculares do cérebro, em regiões de interesse como o córtex e o hipocampo.

3.5 - Contagem de Parasitemia

Nos dias 3 e 6 após a infecção, foram preparadas lâminas de esfregaço sanguíneo coradas com Panótico rápido. Após a preparação, as lâminas foram levadas ao

microscópio ótico sob objetiva de 100 X e no campo foram contabilizadas 100 hemácias contendo ou não formas do parasita em seu interior. Os parasitas observados fora de hemácias não foram contabilizados.

3.6 - Avaliação do Dano Cognitivo

3.6.1 - *Freezing*

O ensaio de *freezing* foi realizado para análise da formação do dano cognitivo ao 15º e 16º dias após a infecção. Este ensaio comportamental é realizado em 2 sessões: na sessão treino, um animal por vez é colocado em uma caixa com fundo contendo barras metálicas ligadas a uma fonte geradora de eletricidade, onde o animal explora o ambiente durante 3 minutos. Ao final do tempo, o animal recebe 2 choques consecutivos de 0,6 mA por 3 segundos, com intervalo de 30 segundos entre os choques; A sessão teste é realizada 24 horas após a sessão treino, onde o animal retorna a caixa e é contabilizado o tempo de imobilidade do animal durante 3 minutos (Bekinschtein P et al., 2007).

3.6.2 – Labirinto aquático de morris (*Water Maze*)

Durante as sessões treino, o animal foi colocado em uma piscina, com 1 m de diâmetro contendo uma plataforma submersa em um dos quadrantes, onde foi contabilizado o tempo que o animal necessitou para encontrar a plataforma submersa. As sessões treino ocorreram uma vez ao dia, durante 4 dias. No quinto dia de experimento, a plataforma é retirada e o animal retorna a piscina, onde registramos o tempo em que o animal permaneceu no quadrante que havia a plataforma durante as sessões treino (Morris R G, 1984).

3.7 – Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

3.7.1 - Extração de mRNA total

As amostras de córtex dos tecidos cerebrais foram extraídas no 6º dia pós-infecção, após a eutanásia dos animais dos grupos experimentais previamente determinados. Cada amostra, individualmente, foi embebida e homogeneizada em 1mL de Trizol. Após a etapa de homogeneização, o líquido resultante foi transferido totalmente para tubo eppendorff de 1,5 mL, onde foi adicionado 200 µL de clorofórmio por tubo e homogeneizado durante 30 s em vórtex. Em seguida, as amostras foram centrifugado a 12000 g por 15 minutos a 4º C. Após a centrifugação, coletou-se a fase aquosa e adicionou-se 500 µL de isopropanol, seguido homogeneização durante 30 s em vórtex. Após a homogeneização, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos e, depois, centrifugados a 12000 g por 15 minutos a 4º C. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1 mL de etanol 75% (etanol 100% diluído em água DEPC – água livre de nucleases) por tubo e agitou-se em vórtex durante 30 s. Após, centrifugou-se os tubos a 12000 g por 5 minutos a 4º C e descartou-se o sobrenadante. O *pellet* formado foi ressuspensão em 20µL de água DEPC e dosou-se a quantidade de RNA total por espectrofotometria (Nanodrop – Thermo Scientific Nanodrop 2000), através da análise da relação 260/280 nm.

3.7.2 - Síntese do cDNA

Foram adicionados por tubo: 1µL de Oligo DT; 1µL DNTP; 1µg de RNA; e completar até o volume final de 10 µL com água DEPC. Após, os tubos foram aquecidos à 65º C por 5 minutos e resfriados em gelo por 1 minuto. Após esta primeira etapa, foram adicionados 9 µL de mix contendo 2µL de 10X RT Buffer; 4µL de 25mM MgCl₂; 2 µL

de 0,1 DTT; e 1µL de RNase OUT e, novamente, os tubos foram aquecidos à 65° C por 5 minutos e resfriados em gelo por 1 minuto. Após, foi adicionado 1µL de Superscript II RT por tubo e, logo após, os tubos foram aquecidos a 42° C por 50 minutos, 72° C por 15 minutos e resfriados em gelo por 1 minuto. Após, foi adicionado 1µL de RNase H por tubo e, finalmente, os tubos foram aquecidos à 37° C por 20 minutos.

3.7.3 - PCR em tempo real

Para o experimento, foram feitas placas de 96 poços para PCR em tempo real e cada poço continha: 10µL *Power SYBR-green*; 0,6 µL de *primer foward e reverse* (concentração final de 300 nM no poço); 7,8µL de água DEPC; e 1µL de cDNA. Após a preparação da placa, a mesma foi levada ao equipamento Step-One (Applied Biosystems), onde por meio do software de mesmo nome do equipamento, foram determinados os ciclos para a realização do PCR. Durante a corrida, o software registra a curva de amplificação da sequência de primer de interesse. Finalizada a corrida, o software registra os *Ct*'s das amostras amplificadas. A partir desses *Ct*'s, os dados são analisados pelo método de $2^{-\Delta\Delta ct}$ (Livak K J, Schmittgen T D, 2001).

3.7.4 - Sequência de Primers

ICAM Left Primer (AGC ACC TCC CCA CCT ACT TT); ICAM Right Primer (AGC TTG CAC GAC CCT TCT AA); iNOS Left Primer (CAC CTT GGA GTT CAC CCA GT); iNOS Right Primer (ACC ACT CGT ACT TGG GAT GC); TNF Left Primer (AGC CCC CAG TCT GTA TCC TT); HIF1A Left Primer (CAA GAT CTC GGC GAA GCA A); HIF1A Right Primer (GGT GAG CCT CAT AAC AGA AGC TTT); TNF Right Primer (CTC CCT TTG CAG AAC TCA GG). Arginase Left Primer (GTG AAG AAC CCA CGG TCT GT); Arginase Right Primer (CTG GTT GTC AGG GGA GTG TT).

3.8 - Imunohistoquímica (IHC):

Os animais foram perfundidos com salina estéril e, logo após, foram perfundidos com paraformaldeído (PFA) 4% antes da coleta das amostras do tecido cerebral. Após a extração, as amostras foram embebidas em PFA 4% e, posteriormente foram embebidas em sacarose 20% para criopreservação. Depois de congelados, os cérebros foram levados ao Criostato para a realização de crio-cortes. A cada corte de 30 μ M realizado, a fatia resultante era colocada em PBS com azida 0,1% em placas de 24 poços com fundo chato.

Após a realização dos criocortes, o PBS com azida foi substituído por PBS e, em seguida, o PBS foi substituído por 300 μ L de tampão de bloqueio (tampão fosfato 0,1M; 0,3% Triton; 5% soro de cabra; 3% albumina sérica bovina; pH = 7,4) e deixado sob agitação por 1 hora. Após o bloqueio, adicionou-se 250 μ L de solução do anticorpo primário anti-Iba-1 (*ionized calcium-binding adapter molecule 1*, preparado em coelho) na proporção de 1:400 em tampão de bloqueio, mantendo-se em agitação *overnight*.

Após este período, os cortes foram adicionada a 250 μ L do anticorpo secundário (Alexa 488 anti-IgG de coelho, preparado em cabra) na proporção de 1:1000 em tampão de bloqueio durante 2 horas. Finalizado o tempo de exposição ao anticorpo secundário, os cortes foram lavados em PBS duas vezes e, finalmente, foram preparadas lâminas com *Vectashield* com DAPI nos cortes para serem levadas ao microscópio de fluorescência (Olympus BX51). Foram registradas imagens com as objetivas de 40x e 20x.

3.9 - Western Blotting:

Os animais eutanaziados foram perfundidos com salina estéril e amostras de córtex e hipocampo foram extraídas. Posteriormente, as amostras foram homogeneizadas em tampão Ripa (150 mM NaCl; 1% Triton; 0,5% deoxicolato de sódio; 0,1% SDS; 50 mM

Tris; pH = 8,0) - 1mL para córtex e 0,5 mL para o hipocampo - contendo os inibidores de protease e fosfatase (pastilha Complete® - Roche), e sonicadas por 10 minutos, ambos os procedimentos em gelo. Em seguida, as amostras foram transferidas a tubos eppendorff de 1,5 mL, centrifugadas a 14000g por 15 minutos e os sobrenadantes resultantes foram coletados. Após a coleta do sobrenadante, foi realizado a dosagem de proteínas pelo método de reação ao ácido becínconínico (BCA). O método BCA foi preparado adicionando-se cinquenta partes do reagente A (BCA – A) a uma parte do reagente B (BCA – B). Foi realizado uma curva padrão (2 mg/ mL a 0,01562 mg/ mL) através de diluições seriadas de albumina humana fornecida pelo próprio fabricante do kit.

Após a dosagem de proteínas, as amostras foram diluídas em tampão de amostra (50 µM Tris; 10% SDS; Glicerol; β-mercaptoetanol; azul de bromofenol) para que fosse adicionado 50 µg de proteínas totais por poço do gel. As amostras foram levadas ao gel de poliacrilamida (4-20%) que foi submetido a uma corrente de 110V por aproximadamente 2 horas. Em seguida a corrida, os géis foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Odyssey system™) previamente ativadas em metanol 100%. A transferência foi realizada a 45V por gel, no decorrer de 90 minutos em sistema semi-seco (Amersham Biosciences), com a utilização de tampão de transferência (Tris-Glicina 1X e metanol 20%).

Após a transferência, as membranas foram embebidas em tampão de bloqueio (5% albumina bovina e TBS-Tween) por uma hora com solução bloqueadora preparada com BSA (*Bovin Serum Albumin*) 5% diluída em TBS-Tween (10 mM de Tris; 150 mM NaCl; 0,05% Tween; pH = 7,4). Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo primário diluído em solução de bloqueio e TBS-Tween na proporção 1 para 1000 durante a noite (*overnight*). Após o período de incubação com anticorpo primário, a membrana foi embebida em solução contendo os anticorpos secundários (anti-coelho, ou anti-

camundongo – Li-Cor Biosciences), diluídos em TBS-Tween, durante trinta minutos. Após a exposição das membranas aos anticorpos, as membranas foram escaneadas e o registro das bandas de interesse foi realizado por densitometria, utilizando o software Odyssey Infrared Imaging system®. Para avaliação da ativação de mediadores anti-inflamatórios, foi utilizado o anticorpo para arginase-1 (coelho – Cell Signalling). Para avaliação da ativação da via de morte celular, foi utilizado o anticorpo para caspase-3 (coelho – Abcam). Para marcação de β -actina, foi utilizado o anticorpo anti-actina (cabra – Abcam).

3.10 – Análise da Formação de Edema e Comprometimento da Barreira Hematoencefálica

Os camundongos foram injetados com 0,2 mL de Azul de Evans 2% (Sigma) via intravenosa (i.v) ao sexto dia após a infecção, uma hora após o tratamento com minociclina e, uma hora após a injeção do Azul de Evans, os animais foram levados a óbito. Após a morte dos animais, foram coletadas amostras de tecido cerebral que foram pesadas em balança de precisão e, após, os tecidos foram embebidos individualmente em 3 mL formamida para extrair o Azul de Evans do tecido cerebral. A absorbância foi medida a 620 nm em leitora de placa. Após determinar a concentração de Azul de Evans e o peso de cada cérebro, foi realizada a razão entre a concentração (mg/mL) e o peso do cérebro (g).

3.11 – Análise Estatística

Para as análises do Azul de Evans, PCR e *Western Blotting* foram feitas análises descritiva de média \pm erro-padrão da média. A comparação entre as variações em torno das médias dos grupos experimentais foi realizada pelo teste One-Way ANOVA (Tukey:

Multiple Comparison Test). Em todas as análises foram considerados valores significativos estatisticamente de $P < 0,05$. A análise para a significância da curva de sobrevida foi realizada pelos testes Log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon.

4. Resultados:

4.1 – O tratamento com Minociclina não impediu o crescimento da parasitemia e não preveniu a mortalidade associada a infecção com o *Plasmodium berghei* ANKA

A figura 7 mostra o efeito do tratamento com minociclina na parasitemia, escore clínico e curva de sobrevivência de camundongos C57Black/6 infectados com PbA. Ao sexto dia após a infecção, os animais que receberam o tratamento com minociclina apresentaram uma menor porcentagem de parasitemia, mas após o fim do tratamento, não é observada diferença significativa (Figura 7A). Também ao sexto dia, observamos que os animais tratados com minociclina apresentaram uma redução significativa dos sintomas clínicos de malária (Figura 7B). Não houve diferença significativa na porcentagem de sobrevivência entre o grupo infectado com PbA e o grupo infectado que não recebeu tratamento (Figura 7C).

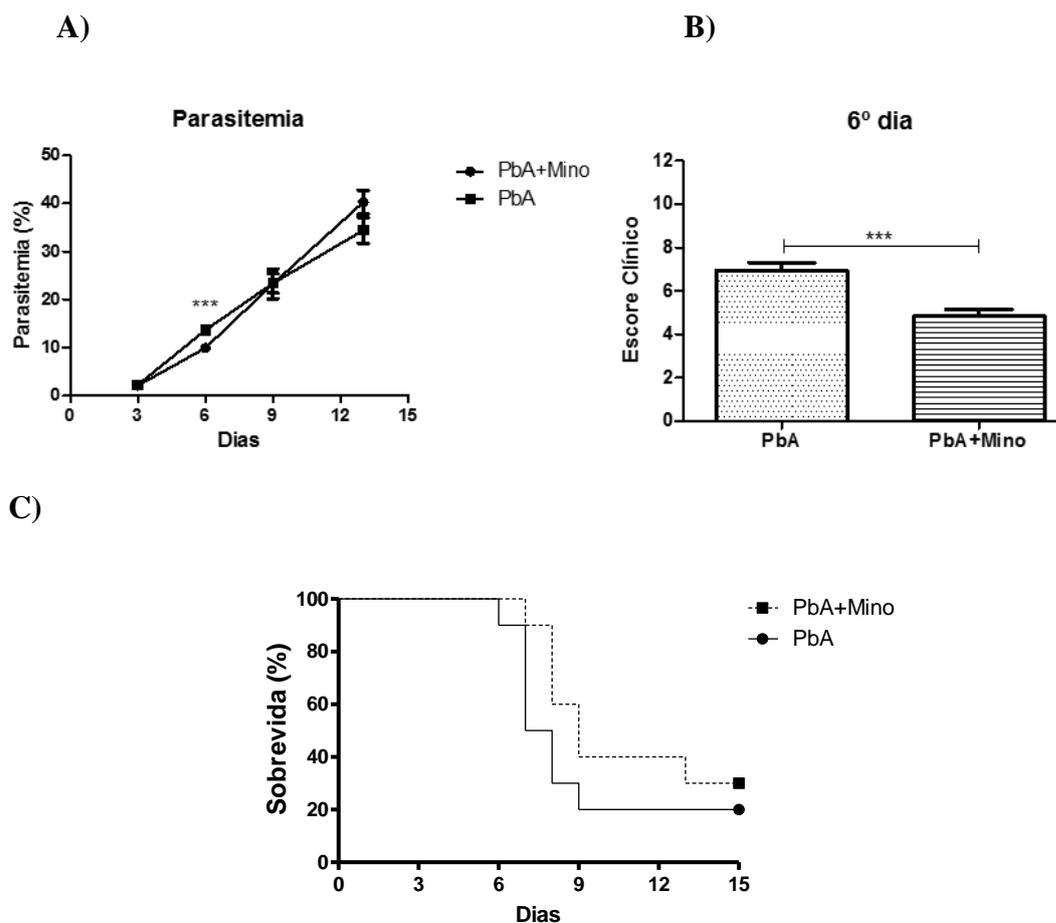


Figura 7. Efeito do tratamento com Minociclina na malária experimental. Avaliação da parasitemia, n= 5-25/grupo. ***P = 0,0001. Teste-T (A); Escore clínico realizado ao 6º dia após a infecção, n=25/grupo. Teste-T (B); Curva de sobrevivida observada ao decorrer de 15 dias após a infecção com PbA, n=10/grupo. Log-rank (Mantel-Cox) e Gehan-Breslow-Wilcoxon (C);

4.2 - O tratamento com minociclina preveniu o comprometimento da barreira hematoencefálica.

Utilizando a injeção do azul de Evans (2%) como marcador para avaliar a permeabilidade da barreira hematoencefálica, podemos observar que o grupo infectado com PbA apresentou um aumento significativo na concentração de azul de Evans no tecido cerebral em relação ao grupo RBC. O grupo que recebeu o tratamento com minociclina apresentou uma redução significativa na concentração de azul de Evans no

tecido cerebral, quando comparado ao grupo infectado com PbA. Não houve diferença significativa entre o grupo RBC e o grupo infectado com PbA tratado com minociclina (Figura 8).

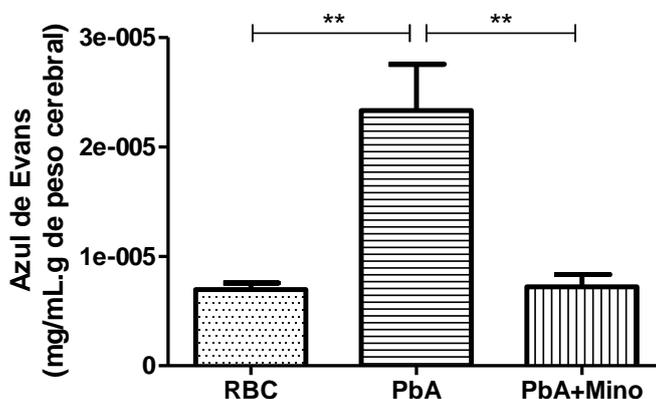


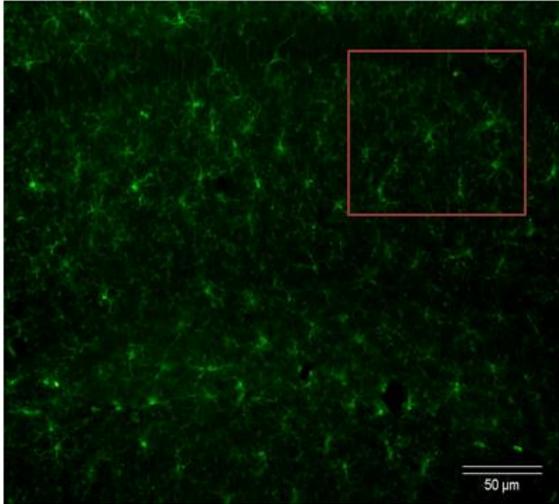
Figura 8. Efeito do tratamento na integridade da barreira hematoencefálica. Relação da concentração de azul de Evans e o peso do tecido cerebral em gramas (g). N=5/grupo. ***P<0,001 One-Way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test).

4.3 – A administração de Minociclina reduziu a ativação de células de micróglia na região CA1 do hipocampo.

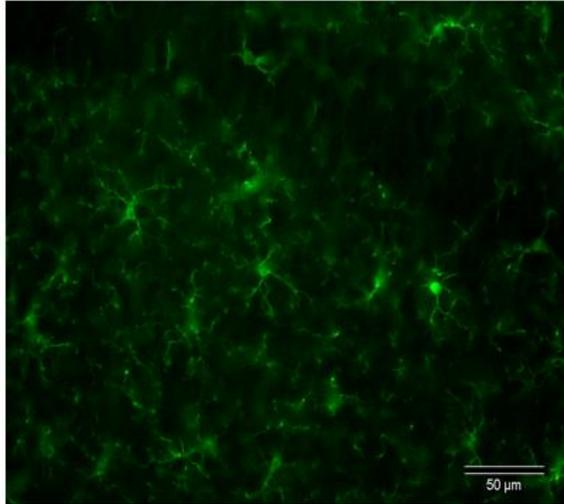
A Figura 9 mostra o efeito do tratamento com minociclina na ativação de células da micróglia através da marcação com Iba-1. As imagens foram registradas pelo microscópio de fluorescência com objetivas de 20x (Figura 9A; 9C; 9E) e 40x (Figura 9B, 9D; 9F). As células da micróglia do grupo RBC apresentam morfologia bastante ramificada (Figura 9A e 9B). O grupo infectado com PbA apresentou células da micróglia com uma quantidade menor de prolongamentos e com o corpo celular maior, em relação ao grupo RBC (Figura 9C e 9D). O grupo infectado com PbA e tratado com minociclina apresentou células ramificadas e, também células ativadas (Figura 9E e 9F). A Figura 9G mostra a porcentagem de células da micróglia ativadas, onde observamos que o grupo PbA apresenta uma porcentagem de células ativadas significativamente maior em relação ao

grupo RBC. O tratamento com minociclina foi capaz de reduzir significativamente a ativação de células da micróglia em relação ao grupo PbA, não havendo diferença entre o grupo RBC e o grupo infectado com PbA tratado com minociclina.

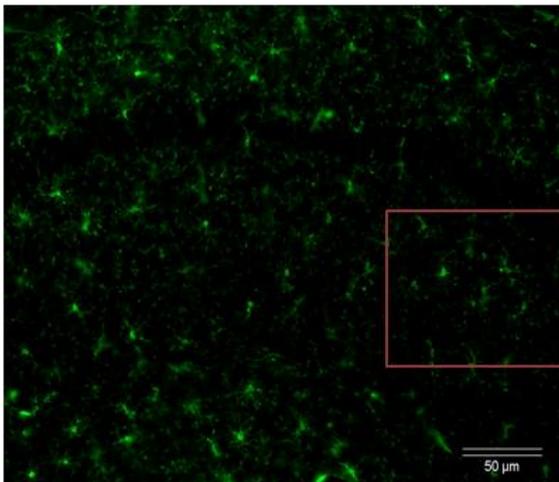
A)



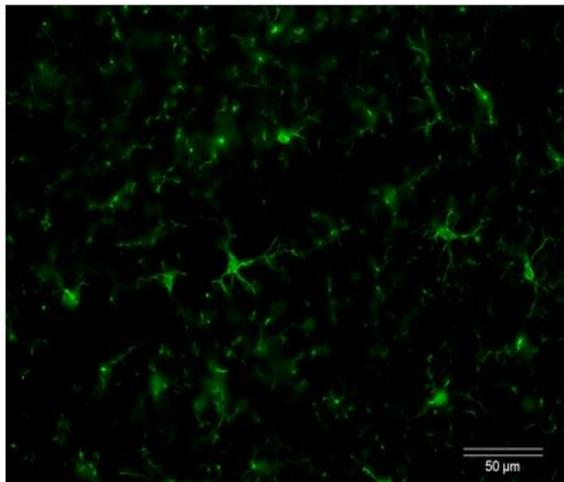
B)



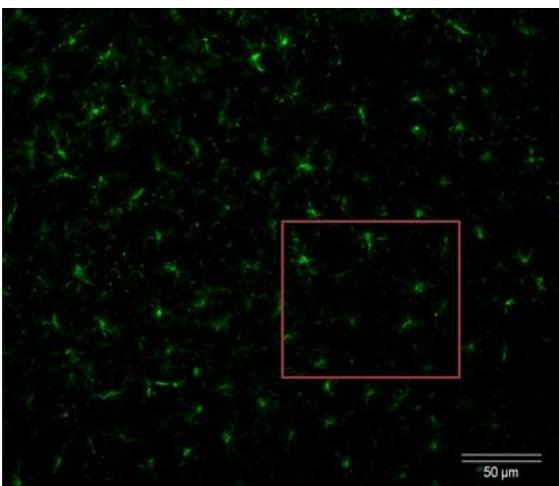
C)



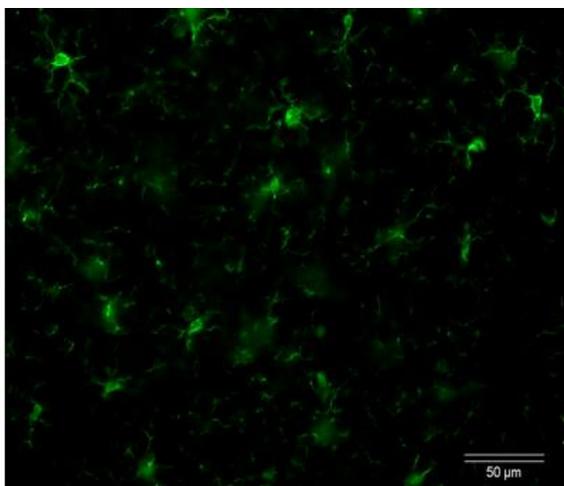
D)



E)



F)



G)

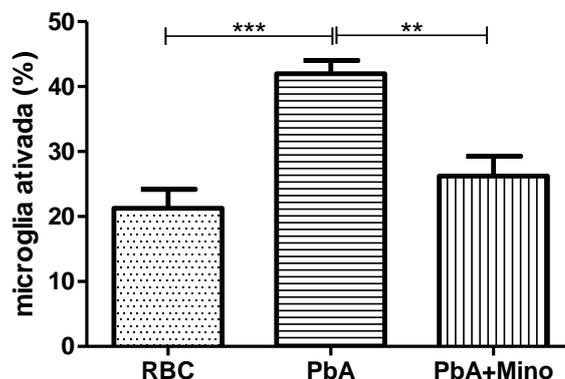


Figura 9. Efeito do tratamento com Minociclina na ativação de células da microglia.

Imunohistoquímica com marcação para Iba-1 de amostras de cérebro coletadas no sexto dia após a infecção com PbA. Foram feitas fotos da região CA1 do hipocampo dos grupos RBC (figura 9A e 9B), PbA (figura 9C e 9D) e PbA tratado com minociclina (figura 9E e 9F). Porcentagem de células da microglia ativadas (figura 9G). ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ One-Way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test).

4.4 - Os animais tratados com Minociclina apresentaram redução na expressão de mRNA de ICAM no hipocampo.

A expressão do mRNA de ICAM-1, foi realizada por PCR em tempo real de amostras de hipocampo. Como podemos observar na Figura 10, o grupo infectado com o PbA apresentou um aumento significativo do mRNA de ICAM-1, quando comparado ao grupo RBC. O grupo PbA tratado com minociclina apresentou uma redução significativa na expressão do mRNA de ICAM-1, quando comparado ao grupo PbA. Houve diferença estatística entre os grupos RBC e PbA tratado com minociclina.

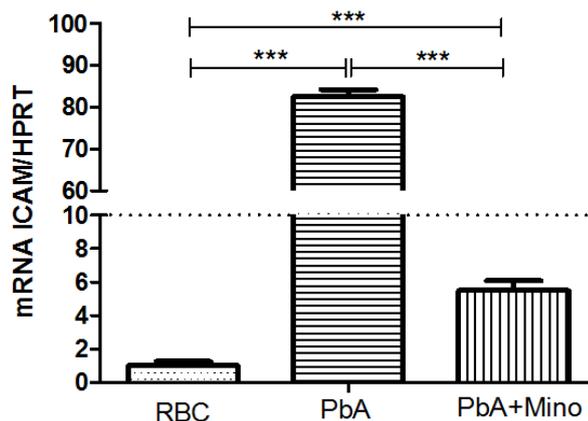


Figura 10. Efeito da minociclina na expressão de ICAM-1 em amostras de hipocampo. Expressão relativa do mRNA de ICAM-1 por PCR em tempo real de amostras de hipocampo extraídas no 6º dia pós-infecção com PbA. Para calcular a expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *P<0,05 One-Way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test). N = 5/grupo.

4.5 - O tratamento com Minociclina reduziu os níveis de mRNA de iNOS no hipocampo.

A expressão do m-RNA de iNOS foi avaliado por PCR em tempo real de amostras de hipocampo extraídas no sexto dia após a infecção. Como pode ser observado na figura 13, os animais infectados com PbA apresentaram um aumento significativo na expressão de iNOS quando comparados ao grupo RBC. O grupo infectado com PbA e tratado com minociclina apresentou uma redução significativa da expressão de iNOS quando comparado ao grupo PbA. Não houve diferença estatística entre os grupos RBC e PbA tratado com minociclina.

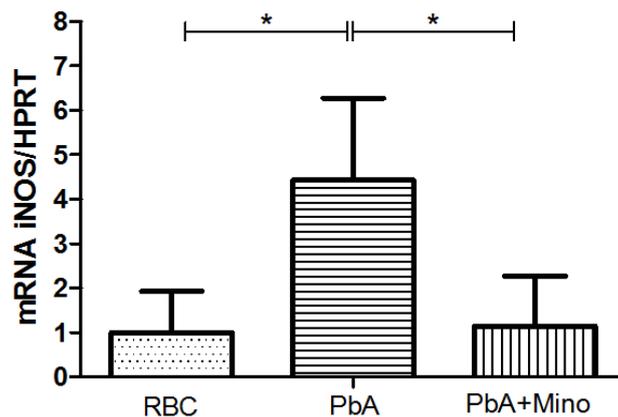


Figura 11. Efeito da administração de minociclina na expressão de iNOS no hipocampo. Expressão relativa do mRNA de iNOS por PCR em tempo real de amostras de hipocampo extraídas no 6º dia pós-infecção com PbA. Para calcular a expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * $P < 0,05$ One-Way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test). N = 5-7/grupo.

4.6 - O tratamento com Minociclina não alterou a expressão do mRNA de HIF-1 α no hipocampo.

A figura 12 representa a expressão relativa do mRNA de HIF-1 α obtidos por PCR em tempo real de amostras de hipocampo. Não houve diferença estatística na expressão de HIF-1 α entre os grupos no hipocampo.

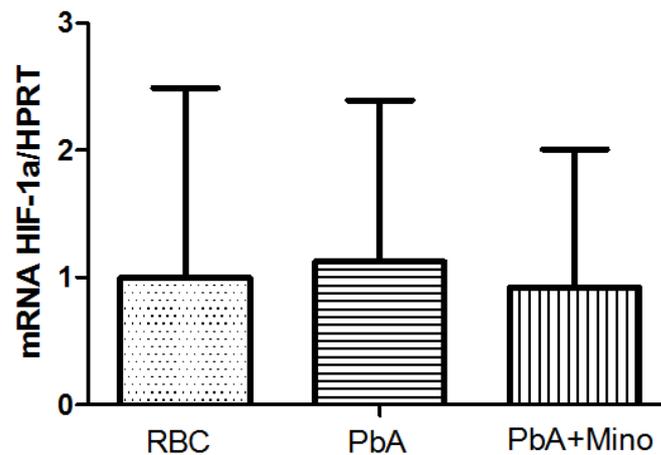


Figura 12. Efeito do tratamento com Minociclina na expressão de HIF-1 α no hipocampo. Expressão relativa do mRNA de HIF-1 α por PCR em tempo real de amostras de hipocampo extraídas no 6^o dia após a infecção com PbA. Para calcular a expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. N = 6-7/grupo. One-Way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test).

4.7 - A Minociclina reduziu os níveis do mRNA de TNF- α no hipocampo.

A figura 13 representa a expressão relativa do mRNA de TNF- α obtido por PCR em tempo real de amostras de hipocampo. Como podemos observar, o grupo infectado com PbA demonstrou um aumento significativo nos níveis de mRNA de TNF- α em relação ao grupo RBC. A administração de minociclina foi capaz de reduzir significativamente os níveis do mRNA de TNF- α em relação ao grupo infectado com PbA, não havendo diferença estatística entre o grupo RBC e o grupo tratado com minociclina.

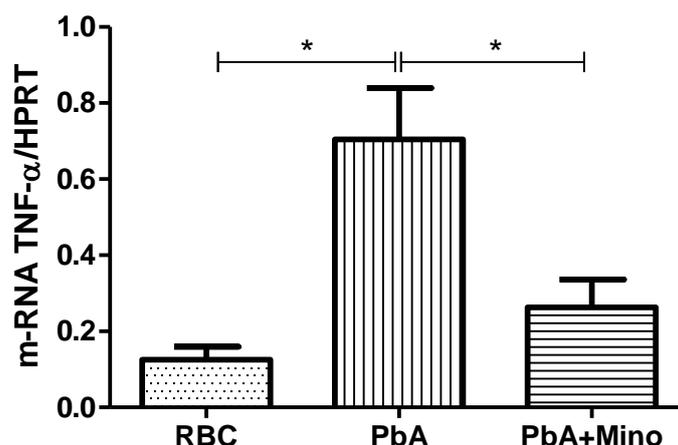


Figura 13. Efeito da administração de minociclina na expressão de TNF- α no **hipocampo**. Expressão relativa do mRNA de TNF- α por PCR em tempo real de amostras de hipocampo extraídas no 6º dia pós-infecção com PbA. Para calcular a expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. *P<0,05 One-Way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test). N = 3/grupo.

4.8 – O tratamento com Minociclina não alterou os níveis de Arginase-1 no hipocampo e no córtex de animais infectados com *Plasmodium bergeri* ANKA.

A expressão de arginase foi realizada por PCR em tempo real (Figura 14A e 14B) e por *western blotting* (Figura 14C) de amostras de hipocampo (Figura 14A) e de córtex (Figura 14B e 14C). Como podemos observar, não houve diferença significativa na expressão de arginase entre os grupos RBC, PbA e PbA tratado com minociclina em ambas as regiões, hipocampo e córtex.

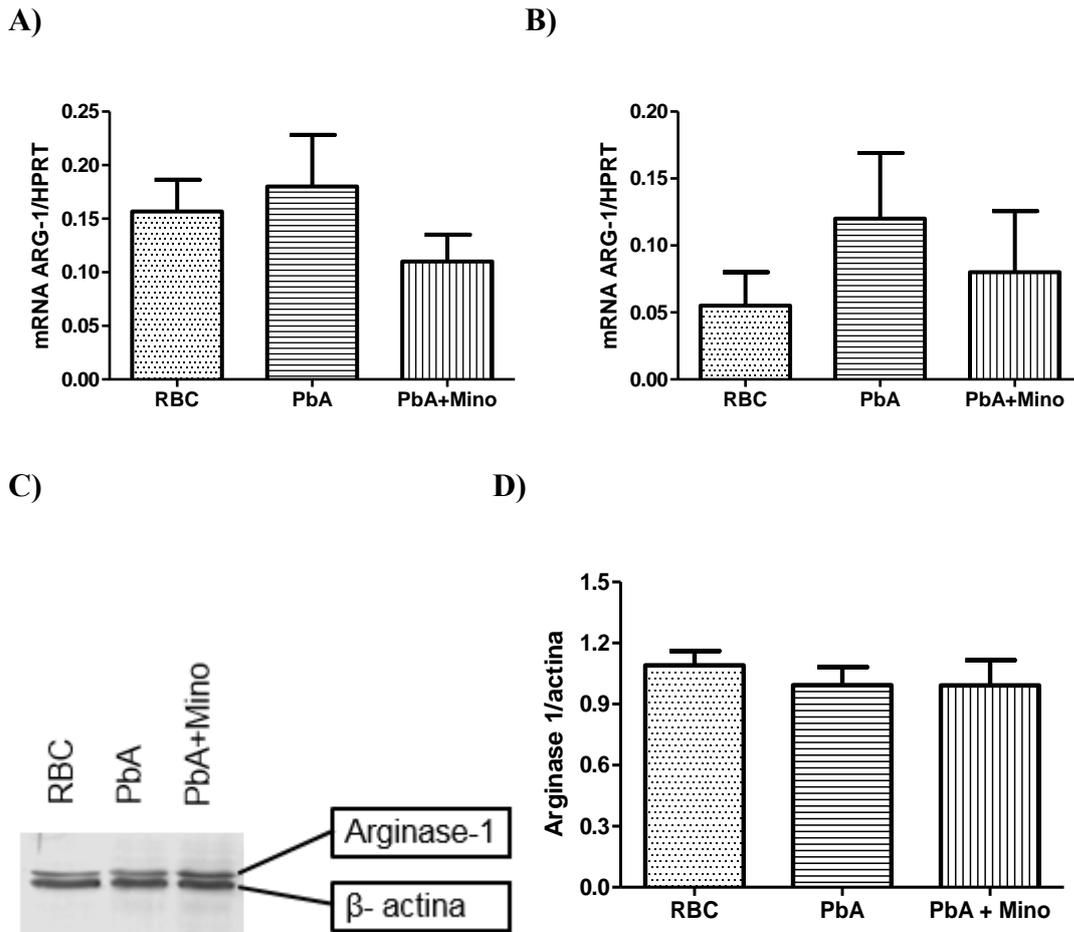
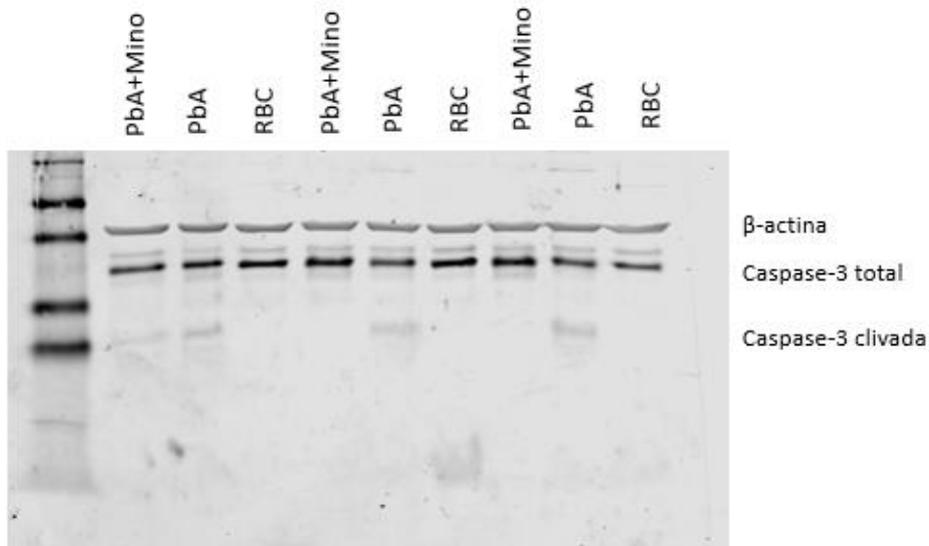


Figura 14: Efeito do tratamento com Minociclina na expressão de arginase em amostras de hipocampo e córtex. Expressão relativa do mRNA de arginase por PCR em tempo real de amostras de hipocampo (A). Expressão relativa do mRNA de arginase por PCR em tempo real de amostras de córtex. Para calcular a expressão relativa, foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. * $P < 0,05$ One-way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test). $N = 3$ /grupo (B). Expressão de arginase por *western blotting* de amostras de córtex de animais submetidos a eutanasia no 6º dia após a infecção com PbA, em gel de poliacrilamida 15% (C) e densitometria obtida das bandas do gel (D). Arginase (Cell Signaling) One-way ANOVA (Tukey: Multiple Comparison Test). $N = 3$ /grupo.

4.9 - A Minociclina reduziu os níveis de Caspase-3 ativada no córtex do modelo de malária cerebral experimental.

Para avaliação da morte celular, foi realizado *western blotting* de amostras de córtex. A Figura 15 mostra a expressão de caspase 3 total e clivada. Como pode ser observado no gel (Figura 15A) e na relação entre a densitometria das bandas de caspase 3 clivada e total (Figura 15B), o grupo PbA apresentou um aumento significativo dos níveis de caspase-3 ativada em relação ao grupo RBC. A administração de minociclina reduziu significativamente os níveis de caspase-3 ativada em relação ao grupo PbA. Não houve diferença significativa entre os grupos RBC e PbA tratado com minociclina.

A)



B)

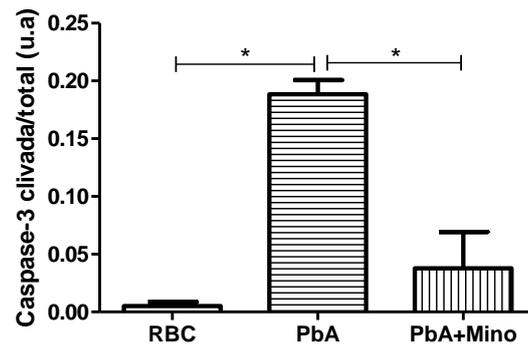


Figura 15. Efeito do tratamento com Minociclina nos níveis de caspase-3. Expressão de caspase-3 por *western blotting* de amostras de córtex de animais submetidos a eutanasia no 6º dia após a infecção com PbA, em gel de poliacrilamida 15% (A) e densitometria obtida das bandas do gel (B). Caspase 3 total (Cell Signaling - 35kDa), Caspase 3 clivada (Cell Signaling - 17/19kDa). * $P < 0,05$ One-way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test), $n = 3$ /grupo.

4.10 - A administração de Minociclina previniu a formação do dano cognitivo em camundongos infectados com PbA.

A figura 16 mostra o resultado obtido a partir dos experimentos de *freezing* (Figura 16) e a figura 17 mostra o resultado obtido pelo método labirinto aquático de Morris (*Water-Maze*) (Figura 17A, 17B e 17C).

Após a apuração do tempo de imobilidade dos grupos experimentais no dia teste do *freezing*, podemos observar que o grupo infectado com PbA apresentou um tempo de imobilidade significativamente menor em relação ao grupo RBC (Figura 16). O grupo infectado com PbA tratado com minociclina apresentou um tempo de imobilidade significativamente maior em relação ao grupo infectado com PbA, inferindo que o tratamento preveniu a seqüela cognitiva em modelo de memória aversiva *freezing*. Não houve diferença significativa entre os grupos RBC e PbA tratado com minociclina.

Para a avaliação do aprendizado e da memória espacial, foi realizado o experimento *Water-Maze*. A Figura 17A demonstra a curva de aprendizado obtida da segunda à quarta sessões treino, onde foram registrados os tempos que os animais levaram para encontrar a plataforma submersa em um dos quadrantes. Como podemos observar, os animais dos grupos RBC e PbA tratado com minociclina apresentaram uma redução no tempo levado para encontrar a plataforma a cada sessão treino, mas o grupo infectado com PbA a mesma redução no tempo levado para encontrar a plataforma no decorrer do experimento. A Figura 17B demonstra o tempo que os animais levaram para encontrar a plataforma na última sessão treino. Como demonstrado pelo gráfico, os animais infectados com PbA apresentaram uma quantidade de tempo significativamente maior para encontrar a plataforma, quando comparado ao grupo RBC (Figura 17B). O tratamento com minociclina foi capaz de reduzir significativamente o tempo que os animais infectados com PbA levaram para encontrar a plataforma submersa (Figura 17B). Na sessão teste,

retirou-se a plataforma e registrou-se o tempo que os animais permaneceram no quadrante onde havia a plataforma das sessões treino. Como podemos observar, os animais infectados com PbA apresentaram tempos significativamente menores em relação ao grupo RBC (Figura 17C). O grupo infectado com PbA tratado com minociclina apresentou tempos de permanência no quadrante significativamente maiores em relação ao grupo PbA (Figura 17C). Não houve diferença estatística entre os grupos RBC e PbA tratado com minociclina. Assim, infere-se que os animais infectados com PbA não foram capazes de consolidar a memória aversiva (Figura 16), bem como apresentaram performances piores no aprendizado (Figura 17A e 17B) e formação de memória espacial (Figura 17B e 17C), e o tratamento com minociclina foi eficaz na prevenção da seqüela cognitiva.

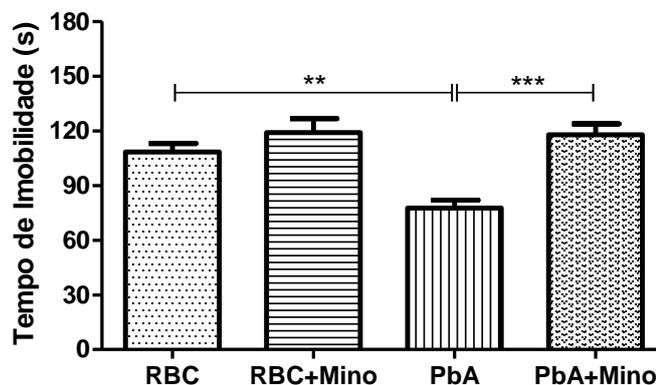
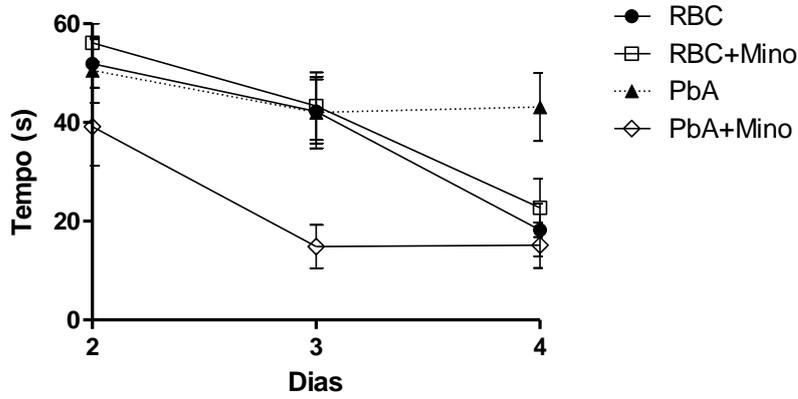
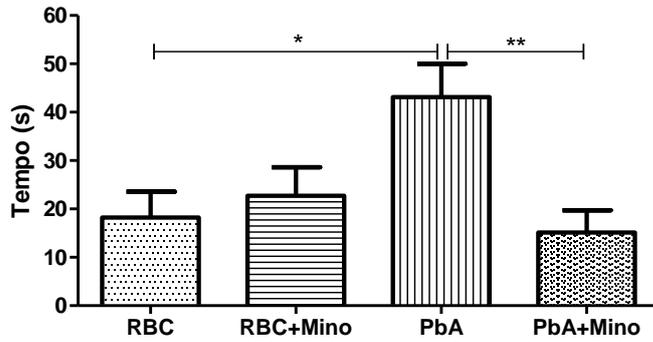


Figura 16. Avaliação do efeito da minociclina no dano cognitivo associado à malária cerebral em modelo de *freezing*. Tempo de imobilidade registrado durante a sessão teste realizado 24 horas após a sessão treino. N = 10 - 17/grupo. **P<0,001; ***P<0,0001 One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

A)



B)



C)

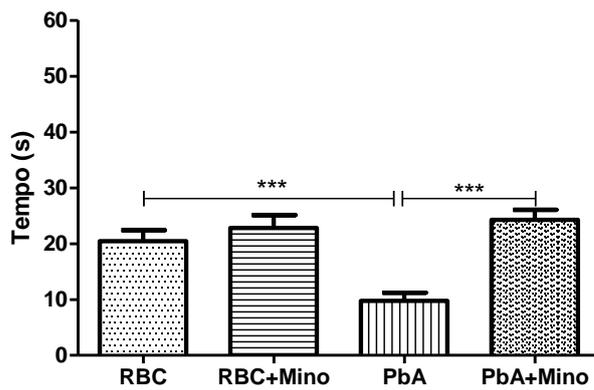


Figura 17. Avaliação do efeito da Minociclina no dano cognitivo associado à malária cerebral no modelo de *Water Maze*. Curva de aprendizado realizada entre o segundo e o quarto dia de treino do experimento *Water-Maze* (A). Tempo levado pelos animais para

encontrar a plataforma na última sessão treino do experimento de *Water-Maze* (B). Tempo em que os animais permaneceram no quadrante onde havia a plataforma durante as sessões treino (C). N = 10-11/grupo. *P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001. One-Way ANOVA (Tukey Multiple Comparison test).

5. Discussão:

A malária é um grave problema de saúde pública e uma das principais causas de morbidade e mortalidade em humanos, sendo essa mortalidade mais alta em crianças até 5 anos de idade. Aproximadamente, 50% da população mundial está em risco de ser infectada por parasitos do gênero *Plasmodium* (OMS, 2015), destaca-se a espécie *P. falciparum* por ser a responsável pelo desenvolvimento das formas mais graves da doença, com o desenvolvimento da malária grave e da malária cerebral (Greenwood et al., 2008; Rosenthal, 2008; Kappe et al., 2010; Wassmer et al., 2015).

A malária cerebral é a pior complicação da malária grave e mais de 500 mil crianças a desenvolvem na região da África sub-Saariana, das quais 110 mil morrem por ano. Em adição, a malária cerebral é a principal causa dos quadros de encefalopatia não traumática em regiões endêmicas (Idro et al., 2005) e, apesar do tratamento com drogas antimaláricas, os pacientes sobreviventes do quadro clínico de malária cerebral podem desenvolver sequelas neurocognitivas, potencialmente irreversíveis. Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos e novas estratégias terapêuticas ainda permanece um grande desafio para médicos e pesquisadores, principalmente no que diz respeito a prevenção de sequelas (Gaillard, Madamet e Pradines, 2015).

Este trabalho utilizou o modelo experimental de malária cerebral com camundongos C57/Black/6 infectados com o *Plasmodium berghei* ANKA, pois este é o modelo mais bem aceito na reprodução de características neuroinflamatórias e no desenvolvimento do dano cognitivo associado à malária grave em humanos pela infecção

com o *Plasmodium falciparum* (Lamb *et al.*, 2006; Reis *et al.*, 2010; Reis *et al.*, 2012; Ong *et al.*, 2013).

As ciclinas são uma família de antibióticos descoberta no início dos anos 1940 e que atuam inibindo a síntese proteica bacteriana. As tetraciclina, nos anos de 1950, foram utilizadas como fármacos antimaláricos e alguns modelos *in vitro* já demonstraram que estas possuem efeito sobre plasmódios, embora seu mecanismo de ação no parasito seja desconhecido (Chin W, Intraprasert R, 1973; Colwel *et al.*, 1973; Noeypatimanond *et al.*, 1983; Alecrim *et al.*, 2006). Inicialmente, foi avaliado o efeito da minociclina no modelo experimental de malária cerebral experimental, e os parâmetros observados foram: a porcentagem de hemácias parasitadas, a gravidade da infecção pelo escore clínico adaptado do protocolo SHIRPA (*SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital phenotype assessment*) por Reis e colaboradores (2012) e a porcentagem de sobrevivida. Os resultados obtidos e representados na figura 7 demonstraram que o uso da minociclina no tratamento da malária experimental conferiu aos camundongos uma diminuição na porcentagem da parasitemia ao sexto dia após a infecção (Figura 7A), bem como também conferiu uma melhora nos sintomas clínicos (Figura 7B). Ao fim do tratamento com minociclina, as parasitemias dos grupos PbA e PbA tratado voltaram a se equivaler. O resultado da curva de sobrevivida (Figura 7C), mostra que o tratamento com minociclina não foi capaz de prevenir a mortalidade associada ao modelo experimental infectado com o *Plasmodium berghei* ANKA. Desta forma, a minociclina não deve ser utilizada como tratamento único contra malária experimental, havendo a necessidade da utilização de fármacos antimaláricos juntamente ao tratamento com minociclina. Nossos resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Apoorv e Babu (2017), pois os mesmos demonstraram que a administração de minociclina foi eficaz no tratamento da malária causada pela infecção com PbA em

fêmeas de camundongos C57/Black/6, bem como conferiu melhora na porcentagem de sobrevivida. Entretanto, o tratamento foi iniciado imediatamente após a infecção com PbA e se estendeu ao decorrer de dez dias. Neste trabalho, observamos que a utilização do tratamento com minociclina do terceiro ao sexto dia não obteve o mesmo resultado. Nós acreditamos que a administração de minociclina após o estabelecimento da infecção com PbA não é capaz de solucionar a infecção com a mesma eficácia de uma droga antimalárica. Nossos resultados estão de acordo com dados da literatura revisados por Gaillard e colaboradores (2015), que relatam que a utilização de tetraciclinas no tratamento da malária não era capaz de prevenir o desenvolvimento das formas mais graves da doença e não deviam ser utilizadas como fármaco único no tratamento da malária.

O comprometimento da barreira hematoencefálica e a formação de edema são uma das principais características observadas na malária cerebral (Brown et al., 1999; Brown et al., 2001). A formação de edema é observada tanto crianças acometidas com malária cerebral, quanto em pacientes adultos. A formação de edema envolve a acumulação de fluido no espaço extracelular do parênquima cerebral por meio do aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Looareesuwan et al., 1995; Cordoliani et al., 1998). No presente estudo, avaliamos o efeito do tratamento no comprometimento da barreira hematoencefálica e na formação de edema cerebral através do método de injeção de azul de Evans. Como pode ser observado na figura 8, os animais infectados com PbA apresentam uma permeabilidade vascular significativamente maior quando comparado ao grupo RBC, bem como nossos dados indicam que a administração de minociclina foi capaz de prevenir este evento. Os astrócitos desempenham uma série de funções essenciais para a homeostase do SNC, como a participação na formação da barreira hematoencefálica (Nones *et al.*, 2010). Acreditamos que o efeito anti-inflamatório da

minociclina também poderia estar atuando na ativação de astrócitos, mas ainda são necessários experimentos que avaliem a ativação de astrócitos, como por exemplo a expressão de *Glial fibrillary acidic protein* (proteína ácida fibrilar glial - GFAP) (Penky *et al.*, 2014).

Em um cérebro saudável, a micróglia apresenta um fenótipo homeostático, que monitora continuamente o ambiente tecidual. O fenótipo homeostático possui como principal característica morfológica a presença de células com uma grande quantidade de ramificações e prolongamentos. Entretanto, em situações de dano tecidual, as células da micróglia se tornam ativadas, há a redução na quantidade dos prolongamentos, juntamente com o aumento do corpo celular e adquirem um fenótipo semelhante à ativação do tipo M1 de macrófagos, como a produção de mediadores pró-inflamatórios (González *et al.*, 2014). Para avaliar a ativação de células da micróglia no modelo experimental de malária cerebral, foram realizadas marcações das células com Iba-1 por imunohistoquímica. Estudos mostraram que Iba-1 é uma proteína que é expressa especificamente em macrófagos e micróglia e está regulada positivamente, uma vez que esta célula seja ativada. Consequentemente, Iba-1 é considerado um marcador bem estabelecido para células da micróglia em trabalhos que realizam marcações por imunohistoquímica (Ito *et al.*, 1998; Okere and Kaba, 2000; Hirayama *et al.*, 2001). A marcação das células da micróglia com Iba-1 observadas na figura 9 mostram que durante a malária cerebral, ao sexto dia após a infecção, as células da micróglia estão ativadas (Figura 9C e 9D), onde observamos células com corpo celular aumentado e redução na ramificação. O tratamento com minociclina foi capaz de reduzir essa ativação, com a presença de células da micróglia mais ramificadas (Figura 9E e 9F). Estas observações foram confirmadas após a contagem da porcentagem de células ativadas (Figura 9G).

A ativação microglial, a qual participa ativamente no processo neuroinflamatório e consequente neurodegeneração, é regulada por diversas interações celulares envolvendo moléculas de superfície, mediadores solúveis, como citocinas, ROS, RNS e neurotransmissores. As interações celulares que regulam a ativação de células da micróglia envolvem a comunicação da micróglia com neurônios, com a barreira hematoencefálica, astrócitos e células T que infiltram no SNC. A neuroinflamação é observada em diversas condições patológicas como o acidente vascular cerebral (AVC), doenças neurodegenerativas e doenças infecciosas, como a malária cerebral (González et al., 2014). O processo neuroinflamatório é caracterizado pela ativação da micróglia, pela formação de edema, comprometimento da barreira hematoencefálica, recrutamento de células do sistema imune, secreção de mediadores inflamatórios e, finalmente, no dano e morte a neurônios (Glass et al., 2010; González et al., 2014). Desta forma, nossos dados sugerem que o tratamento com minociclina preveniu a ativação microglial em um perfil pró-inflamatório.

O acúmulo e sequestro de hemácias parasitadas em diversos órgãos, como o coração, os rins, o fígado e o tecido cerebral, é característico das infecções em humanos pelo *Plasmodium falciparum*. Este sequestro é resultado da interação entre proteínas derivadas do parasita expressas nas membranas de hemácias e moléculas de adesão expressas em células do endotélio vascular do hospedeiro. Em manifestações específicas da malária, alguns receptores para a adesão vêm sendo implicadas como o ICAM-1, a molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e a proteína endotelial C (El-Assaad et al., 2013; Avril et al., 2016). O ICAM-1 apresenta um aumento significativo na sua expressão em células endoteliais de microvasculatura cerebral de pacientes acometidos com a malária cerebral, sendo esta molécula importante no evento de sequestro de eritrócitos parasitados (Turner et al., 1994). No presente trabalho avaliamos a expressão do mRNA

de ICAM-1 de amostras de hipocampo extraídas seis dias após a infecção com PbA, e como podemos observar na figura 10, os animais infectados com PbA demonstraram um aumento significativo na expressão de ICAM-1 quando comparados ao grupo RBC, bem como observamos que os animais infectados com PbA tratados com minociclina apresentaram uma redução significativa, quando comparados ao grupo infectado com PbA.

Em humanos a NOS se apresenta sob três isoformas distintas: a endotelial (eNOS); a neuronal (nNOS) e a forma induzível (iNOS) (Levesque et al., 2010; Percário et al., 2012; Ong et al., 2013). A iNOS é transcrita em resposta a estímulos inflamatórios, como patógenos e mediadores pró-inflamatórios, principalmente por células do sistema imune, como os macrófagos. Citocinas, como TNF- α , IL-1 β e o IFN- γ , ou produtos de patógenos, como o LPS podem induzir a expressão de iNOS (Oates et al., 2006; Levesque et al., 2010). Uma vez que a micróglia se torne superativada e desregulada, dispara-se um perfil de inflamação tecidual crônica que resulta no aumento de fatores neurotóxicos e leva a morte neuronal com o passar do tempo (Burguillos et al., 2011). Neste caso, as células da micróglia se tornam uma fonte proeminente de mediadores inflamatórios como o TNF- α , IL-1 β , NO, peróxido de hidrogênio, superóxido dentre outros. A produção de NO pela micróglia se dá pela iNOS (Block *et al.*, 2007). Para avaliarmos a expressão do mRNA de iNOS, foi realizado PCR em tempo real de amostras de hipocampo extraídas no sexto dia após a infecção com PbA e podemos observar que os animais infectados com PbA demonstraram um aumento significativo na expressão de iNOS, em relação ao grupo RBC e o tratamento com minociclina foi capaz de reduzir significativamente a expressão de iNOS, em relação ao grupo infectado com PbA (figura 11). Os dados da literatura acerca do papel das enzimas NOS e do NO têm sido motivo de controvérsias. Cabrales e colaboradores (2011) hipotetizaram que as disfunções na microcirculação cerebral

observadas na malária cerebral experimental estão atreladas a menor biodisponibilidade de NO e, além disso, demonstraram que a administração de NO confere uma melhora na circulação cerebral em animais infectados com PbA, reduzindo a vasoconstrição, aumentando o fluxo sanguíneo, conferindo proteção ao acúmulo de leucócitos e prevenindo a formação de hemorragias. Entretanto, dados do nosso grupo demonstraram que animais *knock-out* para a enzima iNOS infectados com PbA apresentaram uma melhor performance cognitiva nos ensaios comportamentais de *freezing*, *water-maze* e de esQUIVA inibitória, bem como a utilização do inibidor farmacológico da iNOS, a Aminoguanidina, também conferiu uma melhora no teste de *freezing* (SILVA, Tathiany. *Estudo do papel da Óxido Nítrico Sintase induzível (iNOS) na malária cerebral experimental*. 2017. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro). Desta forma, ainda são necessários mais dados que possam elucidar os papéis das enzimas NOS e do NO durante a malária cerebral experimental.

A polarização do tipo M1 em macrófagos é importante para o para a primeira linha de resposta ao patógeno/ injúria. Este tipo de resposta é regulado por diversos fatores, entre eles ROS e o NO. Os macrófagos estão frequentemente presentes em tecidos em condição de hipóxia, bem como esta condição tecidual altera diretamente as funções macrofágicas. Em resposta à condição de hipóxia, macrófagos expressam fatores de transcrição da família HIF, dentre os membros desta família, o HIF-1 α é ligado a resposta inflamatória do tipo M1 e atividades microbicidas de células mielóides (Takeda et al., 2016). Entre os alvos de atuação do HIF-1 α , temos a iNOS, que também pode ser regulada por outros fatores, como as citocinas (Peyssonnaud *et al.*, 2005). Apesar da importância do fator HIF-1 α na expressão de iNOS em macrófagos, nas células da micróglia não observamos o aumento de expressão de HIF-1 α no grupo infectado com PbA, não

havendo diferença significativa entre os grupos RBC, PbA e PbA tratado com minociclina (Figura 12). Pode-se sugerir que a regulação da iNOS estaria ocorrendo por via de outros mediadores inflamatórios.

As citocinas são polipeptídeos com tamanho variando entre 8-30 kDa, inicialmente caracterizadas como imunomoduladores e possuem variadas funções (Rosenbaum *et al.*, 1998). No SNC, as citocinas estão envolvidas na regulação de diversas funções e a desregulação da atividade está diretamente associada a disfunções neurológicas. Estes polipeptídeos estão ligados aos mecanismos de defesa do SNC, reparo tecidual, regulação da atividade sináptica e estão ligadas à LTP, evento importante na formação de memórias de longa duração. O balanço homeostático consiste no equilíbrio entre mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios. O desequilíbrio resultando em um estado pró-inflamatório estão ligados a doenças neuroinflamatórias, efeitos prejudiciais, culminando em eventos de neurotoxicidade (Viviani *et al.*, 2004; Viviani *et al.*, 2007; Lynch *et al.*, 2010). Nessas condições, a micróglia aumenta a expressão de mediadores como o TNF- α (Block *et al.*, 2007). Como podemos observar na figura 13, os animais infectados com PbA apresentaram um aumento significativo nos níveis de TNF- α , em amostras de hipocampo extraídas no sexto dia após a infecção, quando comparadas com o grupo RBC. O grupo infectado com PbA tratado com minociclina apresentou uma redução significativa nos níveis de TNF- α , quando comparados ao grupo PbA. Este resultado corrobora dados da literatura que relatam o papel modulador da resposta inflamatória da minociclina. Entre as propriedades anti-inflamatórias, temos a redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α , que já foram observadas em modelos *in vivo* de ALS e *in vitro* (Kobayashi *et al.*, 2013).

Miranda e colaboradores (2015) também relatam que essas mudanças no padrão de expressão, assumindo um perfil pró-inflamatório, têm associação com a formação de

sequela cognitiva a curto e longo prazo. O mesmo grupo também retratou a presença de morte celular na região do hipocampo de animais infectados com PbA na malária cerebral experimental (Miranda *et al.*, 2013). Trabalhos publicados também têm associado ao TNF a exacerbação da resposta inflamatória no tecido cerebral (Barbier *et al.*, 2011; Miranda *et al.*, 2013). Nossos dados acerca dos eventos celulares e moleculares associados ao desenvolvimento da malária cerebral corroboram os dados obtidos por Aboorv e Babu (2017), que demonstram a eficácia da administração de minociclina na neuroinflamação durante a malária cerebral.

Em situações de injúria, ou doença inflamatória que acometem o SNC, há uma resposta inflamatória inicial mediada, principalmente, por uma micróglia com perfil pró-inflamatório que é de suma importância, pois há atividades microbidas desencadeadas, como a fagocitose de restos celulares e corpos apoptóticos, as quais são muito importantes para o *clearance* do tecido e a reparação subsequente (González *et al.*, 2014). Após essa ativação primária da micróglia, em um perfil M1, há duas possibilidades de eventos a ocorrerem. A via mais prejudicial, e bastante discutida neste trabalho e na literatura, é a desregulação do perfil pró-inflamatório, culminando na superativação das células da micróglia, iniciando uma inflamação crônica e, também, resultando na produção de mediadores neurotóxicos, danos neuronais, morte celular e sequelas potencialmente irreversíveis. Entretanto, a via mais benéfica ao tecido é, após a ativação M1, a participação de células da micróglia com perfil mais anti-inflamatório (M2) atenuando a inflamação induzida pela resposta do tipo M1 e, concomitante a síntese de mediadores anti-inflamatórios, a produção de fatores neurotróficos, promovendo a regeneração tecidual, resolução da inflamação e o retorno a um perfil homeostático (Burguillos *et al.*, 2011; Shechter *et al.*, 2013; González *et al.*, 2014). As células da micróglia, quando estimuladas por IL-4, IL-10, adquirem um fenótipo de ativação do tipo M2 que é

caracterizada por células da micróglia com finos corpos celulares, com a presença de ramificações e a regulação positiva de marcadores celulares específicos, como a arginase (González *et al.*, 2014). Previamente na figura 9, relatamos que as células da micróglia dos animais que foram tratados com minociclina se apresentavam com ramificações, quando comparadas ao grupo infectado com PbA. Neste trabalho, foram dosados os níveis de expressão do mRNA de arginase-1 por PCR em tempo real e os níveis da proteína por *western blotting*. O resultado desses experimentos (Figura 14) demonstram que os níveis de arginase não variaram significativamente entre os grupos. De forma interessante, observamos que o tratamento com a minociclina não induziu uma resposta do tipo M2. Este dado corrobora os resultados apresentados por Kobayashi e colaboradores (2013), onde foi relatado que o tratamento com minociclina inibia a ativação da micróglia em um perfil M1, mas não induzia uma resposta do tipo M2. Neste mesmo trabalho, em culturas de micróglia estimuladas com LPS, estimulador de perfil M1, Kobayashi e colaboradores relataram que houve um aumento significativo de mediadores inflamatórios, como o TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , e observou que havia uma expressão basal de mediadores anti-inflamatórios, como a Arg-I. Após tratar essas células com minociclina, observou que as citocinas pró-inflamatórias haviam reduzido significativamente, entretanto, o nível de mediadores anti-inflamatórios permaneceram basais.

Previamente neste trabalho, foi discutido o possível desfecho para a exacerbação da resposta pró-inflamatória no tecido cerebral, sendo este desfecho o aumento da citotoxicidade, levando a danos neuronais e possível morte celular. A maquinaria intracelular responsável pela morte celular depende de uma família de proteases denominada caspases e estão diretamente envolvidas na resposta imune e inflamatória. Uma importante caspase é a caspase-3, realizando o papel de efetora da morte celular (Green, 2005). Como podemos analisar na figura 15, o tratamento com minociclina foi

capaz de reverter o aumento nos níveis de caspase 3 ativada que está aumentada durante a infecção com PbA. Desta forma, infere-se que durante a malária cerebral, há a indução da morte celular tecidual e a utilização de um fármaco com propriedades anti-inflamatórias foi capaz de prevenir o aumento de caspase 3 ativada.

A infecção com PbA induziu a exacerbação da resposta inflamatória no hipocampo, uma importante região para o processo de formação de memória, aumentando significativamente os níveis de mediadores pró-inflamatórios, aumentando moléculas de adesão importantes para o evento de sequestro de hemácias parasitadas, induzindo a formação de edema cerebral, o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica e a morte celular (Lamb *et al.*, 2006). Os pacientes que sobrevivem ao quadro de malária cerebral podem desenvolver sequelas neurocognitivas a longo prazo, detectada em aproximadamente 26% de crianças sobreviventes do quadro clínico de malária cerebral. (Carter *et al.*, 2005; Carter *et al.*, 2006; John *et al.*, 2008). Boivin e colaboradores (2007) realizaram testes cognitivos que avaliavam memória de trabalho, atenção e aprendizado em crianças entre 5 e 12 anos que foram acometidas com malária cerebral e demonstraram que 21,4% das crianças sobreviventes do quadro clínico de malária cerebral apresentaram déficits cognitivos.

Reis e colaboradores (2010 e 2012) demonstraram que animais C57/Black/6 infectados com PbA desenvolvem sequela cognitiva a longo prazo após o quadro clínico de malária cerebral, mesmo com a recuperação com o tratamento com cloroquina. Neste trabalho avaliamos a formação de memória aversiva pelo teste de *freezing*, bem como avaliamos a capacidade de aprendizado e formação de memória espacial pelo experimento de *Water Maze*. Como podemos observar na Figura 16 e na Figura 17, respectivamente, os animais infectados com PbA desenvolveram dano cognitivo a longo prazo, refletido nos dados dos experimentos avaliando memória aversiva e memória

espacial e o tratamento com minociclina foi capaz de prevenir a formação do dano cognitivo. Desta forma, nossos dados sugerem que os eventos neuroinflamatórios associados ao quadro clínico de malária cerebral levaram a formação do dano cognitivo a longo prazo e o tratamento com minociclina foi eficaz no tratamento destes eventos, bem como preveniu a formação do dano cognitivo.

Os dados inferem que a ativação das células da micróglia possui papel importante na resposta inflamatória durante a malária cerebral, bem como na formação do dano cognitivo e estratégias que visem a modulação da resposta inflamatória microglial são potenciais alvos terapêuticos na prevenção à sequela cognitiva proveniente da malária cerebral experimental.

6. Conclusões:

A partir dos dados obtidos acerca do desenvolvimento da infecção com o *Plasmodium berghei* ANKA, pode-se concluir que a minociclina não pode ser usada como tratamento único no tratamento da malária cerebral experimental.

Entretanto, a minociclina teve papel importante no tratamento dos eventos neuroinflamatórios associados à malária cerebral experimental, bem como teve papel importante na modulação da ativação de células da micróglia durante a malária cerebral experimental e na modulação da expressão dos mediadores inflamatórios TNF- α e iNOS. Desta forma, pode-se inferir que a ativação da micróglia durante a malária cerebral experimental possui papel importante no desenvolvimento da neuroinflamação e na formação do dano cognitivo após o quadro clínico de malária cerebral.

O tratamento com minociclina foi eficaz na prevenção do dano cognitivo decorrente da malária cerebral experimental. Logo, estratégias terapêuticas que visem modular a resposta neuroinflamatória e a regulação da ativação de células da micróglia se mostraram potenciais alvos terapêuticos.

7. Referências:

1. Abbott NJ, Ronnback L, Hanson E (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 7: 41-53;
2. Aguzzi A, Barres B A, Bennett M L. (2013). Microglia: Scapegoat, Saboteur, or Something Else? *Science* Vol 339: 156-161;
3. Alan F. Cowman and Brendan S. Crabb. 2006. Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites. *Cell* 124, 755-766;
4. Alecrim MG, Lacerda MV, Mourão MP, Alecrim WD, Padilha A, Cardoso BS, et al. Successful treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with a six-dose regimen of artemether-lumefantrine versus quinine-doxycycline in the Western Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 74:20–5;
5. Allen S J, Dawbarn D (2006). Clinical relevance of the neurotrophins and their receptors, *Clinical Science (London)* 110: 175–191;
6. Amtul Z, Atta-ur-Rahman (2015). Neural Plasticity and memory: molecular mechanism. *Rev. Neurosci.* 26(3): 253-268;
7. Antony H. A., Parija S. C. Antimalarial drug resistance: An overview. *Tropical Parasitology* 6(1):30-41;
8. Avril M, Bernabeu M, Benjamin M, Brazier A J, Smith J D (2016). Interaction between endothelial protein C receptor and intercellular adhesion molecule 1 to mediate binding of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes to endothelial cells. *American Society for Microbiology* 7 e00615-16;
9. Banjara M, Gosh C (2017). Sterile neuroinflammation and strategies for therapeutic intervention. *International Journal of Inflammation* 2017, Article ID 8385961, 20 pages;
10. Barbier M et al (2011). Platelets alter gene expression profile in human

brain endothelial cells in an in vitro model of cerebral malaria. PLoS One 6: e19651;

11. Baruch D I (1999). Adhesive receptors on malaria-parasitized red cells. *Baillieres Best Pract Res Clin Hematol* 12: 747-761;

12. Bell DR, Jorgensen P, Christophel EM, Palmer KL. Malaria risk: estimation of the malaria burden. *Nature* 2005; 437: E3-E4. 5;

13. Bhandari PL, Raghuvver CV, Rajeev A, Bhandari PD. Comparative study of peripheral blood smear, quantitative buffy coat and modified centrifuged blood smear in malaria diagnosis. *Indian J Pathol Microbiol* 2008; 51: 108-112;

14. Binder D K, Scharfman HE. 2004. Brain-derived neurotrophic factor. *Growth Factors* 22(3):123-31.

15. Birbeck, G. L., et al., (2010). Blantyre Malaria Project Epilepsy Study (BMPES) of Neurological Outcomes in Retinopathy-Positive Pediatric Cerebral Malaria Survivors: a Prospective Cohort Study. *Lancet Neurol.* 9, 1173-1181. Doi: 10.1016/S1474-4422 (10)70270-2;

16. Block M L, Zecca L, Hong J S (2007). Microglia-Mediated Neurotoxicity: uncovering the molecular mechanism. *Nature Rev. Neurosci.* Vol 8: 57-69;

17. Blum D, Chtarto A, Tenenbaum L, Brotchi J, Leviver M (2004). Clinical potential of minocycline for neurodegenerative disorders. *Neurobiol. Dis.* 17: 359-366;

18. Blum JJ, Yayon A, Friedman S, Ginsburg H (1984). Effects of mitochondrial protein synthesis inhibitors on the incorporation of isoleucine into *Plasmodium falciparum* in vitro. *J Protozool.* 1984;31:475-9.

19. Boivin M J, bangirana P, Byarugaba J, Opoka R O, Idro R, Jurek A M, John C C (2007). Cognitive impairment after cerebral malária in children: a prospective study. *Pediatrics* 2007;119; e360; doi: 10.1542/peds.2006-2027.

20. Brown H, Rogerson S, Taylor T, Tembo M, Mwenechanya J, Molyneux

M, Turner G (2001). Blood brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am J Trop Med Hyg* 64: 207-213;

21. Brewster DR, Kwiatkowski D, White NJ 1990 Neurological sequelae of cerebral malaria in children. *Lancet* 336:1039–1043;

22. Brogden R N, Speight T M, Avery G S (1975). Minocycline: a review of its antibacterial and pharmacokinetic properties and therapeutic use. *Drugs* 1975(4): 251-91;

23. Brown G C, Neher J J., (2014). Microglial Phagocytosis of Live Neurons. *Nat. Neurosci.* Vol 15: 209-216;

24. Brown H, Hien TT, Day N, Mai NT, Chuong LV, et al. (1999) Evidence of blood-brain barrier dysfunction in human cerebral malaria. *Neuropathol Appl Neurobiol* 25: 331–340;

25. Brown H, Rogerson S, Taylor T, Tembo M, Mwenechanya J, et al. (2001) Blood-brain barrier function in cerebral malaria in Malawian children. *Am J Trop Med Hyg* 64: 207–213;

26. Budimulja AS, Syafruddin, Tapchaisri P, Wilairat P, Marzuki S (1997). The sensitivity of Plasmodium protein synthesis to prokaryotic ribosomal inhibitors. *Mol Biochem Parasitol.* 1997; 84:137–41;

27. Burguillos M A, Deieborg T, Kavanagh E, Persson A, Haiji N, Garcia-Quintanilla A (2011). Caspase signalling controls microglia activation and neurotoxicity. *Nature* 472: 319-324;

28. Cabrales P, Zanini G M, Meays D, Frangos J A, Carvalho L J M (2010). Murine cerebral malária is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am J Pathol* 176: 1306-1315;

- 29.** Cabrales P, Zanini G M, Meays D, Frangos J A, Carvalho L J M (2011). Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. *JID* 203:1454-1463;
- 30.** Carter J A, Mung'ala-Odera V, Neville B G, Murira G, Mturi N, Musumba C, Newton C R (2005). Persistent neurocognitive impairments associated with severe falciparum malaria in Kenyan children. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 476-481;
- 31.** Carter JA, Lees JA, Gona JK, Murira G, Rimba K, et al. (2006) Severe falciparum malaria and acquired childhood language disorder. *Dev Med Child Neurol* 48: 51–57.
- 32.** Chaoyun L, Kunxiong Y, Schluesener H (2013). Impact on minocycline on neurodegenerative diseases in rodents: a meta-analysis. *Rev. Neurosci.* 2013; 24(5): 553-562;
- 33.** Cherry J D, Olschowka J A, O'Banion M K (2015). Arginase 1+microglia reduce A β plaque deposition during IL-1 β -dependent neuroinflammation. *Journal of Neuroinflammation* 12:20;
- 34.** Chin W, Intraprasert R. The evaluation of quinine alone or in combination with tetracycline and pyrimethamine against falciparum malaria in Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health.* 1973;4:245–9.
- 35.** Colwell EJ, Hickman RL, Kosakal S. Quinine-tetracycline and quininebactrim treatment of acute falciparum malaria in Thailand. *Ann Trop Med Parasitol.* 1973;67:125–32.
- 36.** Conran N, Franco-Penteado C F, Costa F F (2009). Newer aspects of the pathophysiology of sickle cell disease vaso-occlusion. *Hemoglobin* 33:1-16;

- 37.** Cramer J P et al (2005). Age dependent effect of plasma nitric oxide on parasite density in Ghanaian children with severe malaria. *Tropical Med Int Health* 10: 672-680;
- 38.** Dallerac G, Chever O, Rouach N (2013). How do astrocytes shape synaptic transmission? Insights from electrophysiology. *Front Cell Neurosci.* 7:159;
- 39.** Davalos D. et al (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci*, v. 8, n. 6, p. 752-8, Jun 2005. ISSN 1097-6256;
- 40.** Del Rio-Hortega P (1932). Microglia. In: Penfield W, editor. *Cytology and Cellular Pathology of the nervous system*, Vol 2. New York: Hoeber. Pp 483-534;
- 41.** Desruisseaux M S, Gulinello M, Smith D N, Lee S, Tsuji M, Weiss L M, Spray D C, Tanowitz H B (2008). Cognitive Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei* Strain ANKA. *J Infect Dis* 197(11):1621-1627. Doi: 10.1086/587908;
- 42.** Dheen S T; Kaur C; Ling E A (2007). Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr Med Chem*, v. 14, n. 11, p. 1189-97, 2007. ISSN 0929-8673;
- 43.** Dorovini-Zis, K., et al., (2011). The neuropathology of fetal cerebral malaria in malawian children. *Am. J. Pathol.* 178, 2146-2158. Doi: 10.1016/j.ajpath.2011.01.016;
- 44.** Erdman L K, Finney C A M, Liles W C, Kain K C (2008). Inflammatory pathways in malaria infection: TLRs share the stage with other components of innate immunity. *Mol Biochem Parasitol* 162: 105-111;
- 45.** Fan R, Xu F, Previti M L, Davis J, Grande A M, Robinson J K, Van Nostrand W E (2007). Minocycline reduces microglial activation and improves behavioral deficits in a transgenic model of cerebral microvascular amyloid. *J. Neurosci.*

27: 3057-3063;

46. Farfara D; Lifshitz V; Frenkel D (2008). Neuroprotective and neurotoxic properties of glial cells in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J Cell Mol Med*, v. 12, n. 3, p. 762-80, Jun 2008. ISSN 1582-1838;

47. Gaillard T, Madamet M, Pradines B (2015). Tetracyclines in malaria. *Malar J* 14:445. Doi: 10.1186/s12936-015-0980-0;

48. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Gálvez J (2013). Minocycline: far beyond na antibiotic. *Br. J. Pharmacol.* 169: 337-352;

49. González H, Elgueta D, Montoya A, Pacheco R (2014). Neuroimmune regulation of microglial activity involved in neuroinflammation and neurodegenerative diseases. *J Neuroim* 274: 1-13;

50. Gosh M, Aguirre V, Wai K, Felfly H, Dietrich W D, Pearse D D (2014). The interplay between cyclic amp, mapk, and NF-kB pathways in response to proinflammatory signals in microglia. *BioMed Research International*, Vol 2015, Article ID 308461, 18 pages;

51. Grau, G E; Craig A G (2012).Cerebral malaria pathogenesis: revisiting parasite and host contributions. *Future microbiol.* 7, 291–302.doi: 10.2217/fmb.11.155;

52. Gravenor, M. B., van Hensbroek, M. B., and Kwiatkowski, D. (1998). Estimating sequestered parasite population dynamics in cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 7620-7624. Doi: 10.1073/pnas.95.13.7620;

53. Green D R (2005). Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 121: 671-674;

54. Greter M, Merad M (2012). Regulation of Microglia Development and Homeostasis. *Glia* 61: 121-127. DOI 10.1002/glia.22408;

55. Greter M, Merad M (2013). Regulation of Microglia Development and

Homeostasis. *Glia* 61:121-127;

56. Guan Z, Fang, J., 2006. Peripheral immune activation by lipopolysaccharide decreases neurotrophins in the cortex and hippocampus in rats. *Brain Behav. Immun.* 20, 64–71;

57. Hansen D S (2012). Inflammatory responses associated with the induction of cerebral malaria: lessons from experimental murine models. *PLoS Pathog* 8: e1003045;

58. Heneka M T, Kummer M P, and E. Latz, “Innate immune activation in neurodegenerative disease,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 7, pp. 463–477, 2014;

59. Hirayama A, Okoshi Y, Hachiya Y, Ozawa Y, Ito M, Kida Y, Imai Y, et al. (2001) Early immunohistochemical detection of axonal damage and glial activation in extremely immature brains with periventricular leukomalacia. *Clin Neuropathol* 20:87–91;

60. Holland CA, Kiechle FL. Point-of-care molecular diagnostic systems—past, present and future. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 504- 509. 24;

61. Hora R, Kapoor P, Thind K K, Mishra P C (2016). Cerebral malaria – Clinical manifestations and pathogenesis. *Metab Brain Dis* 31:225-237. DOI: 10.1007/s11011-015-9787-5;

62. Idro R, Jenkins N E, Newton C R J C (2005). Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malária. *Lancet Neurol* 4: 827-840;

63. Ito D, Imai Y, Ossawa K, Nakajima K, Fukuuchi Y, Kohsaka S (1998). Microglia-specific localization of a novel calcium binding protein, Iba 1. *Brain Res Mol Brain Res* 57(1):1-9;

64. Izquierdo I, Bevilaqua L, Rossato J, Bonini J, Medina J, Cammarota M (2006). Different molecular cascades in different sites of the brain control memory

consolidation. Trends in Neurosciences 29: N°9. Doi:10.1016/j.tins.2006.07.005;

65. Izquierdo I, Medina J H (1997). Memory formation: the sequence of biochemical events in the hippocampus and its connections to activity in other brain structures. Neurobiology of learning and memory 68: 285-316;

66. Izquierdo I, Medina J H, Vianna M R M, Izquierdo L A, Barros D M (1999). Separate Mechanisms for short- and long- term memory. Behavioral Brain Research, 103: 1-11;

67. Izquierdo I; Pereira M E (1989). Post-training memory facilitation blocks extinction but not retroactive interference. Behav Neural Biol, v. 51, n. 1, p. 108-13, Jan 1989. ISSN 0163-1047;

68. Jeney, V., J. Balla, A. Yachie, Varga, G.M. Vercellotti, J.W. Eaton and G. Balla (2002). Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. Blood. 100:879-887;

69. John C C, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka R O, Idro R, Jurek A M, Wu B, Boivin M J (2008). Cerebral malária in children is associated with long-term cognitive impairment. Pediatrics 2008; 122; e92-e99; doi: 10.1542/ peds. 2007-3709.

70. Jordan J, Fernandez-Gomez F J, Ramos M, Ikuta I, Aguirre N, Galindo M F (2007). Minocycline and cytoprotection: shedding new light on a shadowy controversy. Curr. Drug. Deliv. 4: 225-231;

71. Joshi V, Agurto C, Barriga S, Nemeth S, Soliz P, MacCormick I J, Lewallen S, Taylor T E, Harding S P (2017). Automated detection of malarial retinopathy in digital fundus images for improved diagnosis in malawian children with clinically defined cerebral malaria. Nature Scientific Reports 7: 42703. Doi: 10.1038/srep42703;

72. Kaplan D R, Miller, F D (2000). Neurotrophin signal transduction in the nervous system. Curr. Opin. Neurobiol. 10, 381–391;

- 73.** Kiatfuengfoo R, Suthiphongchai T, Prapunwattana P, Yuthavong Y (1989). Mitochondria as the site of action of tetracycline on *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol.* 1989;34:109–15.
- 74.** Kobayashi K, Imagama S, Ohgomori T, hirano K, Uchimura K, Sakamoto K, Hirakawa A, Takeuchi H, Suzumura A, Ishiguro N, Kadomatsu K (2013). Minocycline selectively inhibits M1 polarization of microglia. *Cell Death and Disease* 4, e525; doi: 10.1038/cddis.2013.54;
- 75.** Lamb T J, Brown D E, Potocnik A J, Langhorne J (2006). Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 8(6): 1-22;
- 76.** Lauro C, Catalano M, Trettel F, Limatola C (2015). Fractalkine in the nervous system: neuroprotective or neurotoxic molecule? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1351: 141-148;
- 77.** Lessmann, V., Gottmann, K., Malcangio, M., 2003. Neurotrophin secretion: current facts and future prospects. *Prog. Neurobiol.* 69, 341–374;
- 78.** Liao B, zhaow, Beers DR, Henkel JS, Appel SH. Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Exp Neurol* 2012; 237: 147–152;
- 79.** Livak K J; Schmittgen T D (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods* 25, 402-408;
- 80.** Lossinsky A S; Shivers R R (2004). Structural pathways for macromolecular and cellular transport across the blood-brain barrier during inflammatory conditions. Review. *Histol Histopathol*, v. 19, n. 2, p. 535-64, Apr 2004. ISSN 0213-3911;
- 81.** Lu B and Chow A. (1999) Neurotrophins and hippocampal synaptic transmission and plasticity. *J. Neurosci. Res.* 58, 76–87;

- 82.** Lynch M A (2004). Long Term Potentiation and Memory. *Physiol Rev*, 84: 87-136;
- 83.** Marchi N, Tierney W, Alexopoulos A V, Puvenna V, Granata T, Janigro D (2011). The ethiological role of blood-brain barrier dysfunction in seizure disorders. *Cardiovascular Psychiatry and Neurology*, (482415). Doi: 10.1155/2011/482415;
- 84.** Martins Y C, Werneck G L, Carvalho L J, Silva B P T, Andrade B G, Souza T M, Souza D O, Daniel-Ribeiro C (2010). Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol. *Malaria Journal* 9:85;
- 85.** Matuschewski K (2013). Murine infection models for vaccine development. The malaria example. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9(3): 450-456;
- 86.** Mcgaugh J L (2000). Memory – A century of consolidation. *Science* 287: 248-251;
- 87.** Medana I M, Turner G D H (2006). Human cerebral malaria and the blood brain barrier. *Int J Parasitol* 36: 555-568;
- 88.** Medana IM, Hunt NH, Chan-Ling T. Early activation of microglia in the pathogenesis of fatal murine cerebral malaria. *Glia* 1997;19:91–103. [pubmed: 9034826];
- 89.** Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor necrosis factor- α expression in the brain during fatal murine cerebral malaria: evidence for production by microglia and astrocytes. *Am J Pathol* 1997;150:1473–86. [pubmed: 9095002];
- 90.** Miller L H, Baruch D I, Marsh K, Doumbo O K (2002). The pathogenic basis of malaria. *Nature* 415, 673-679;
- 91.** Miranda A S et al (2013). Further evidence for an anti-inflammatory role of artesunate in experimental cerebral malária. *Malar J*, 12: 1-13;
- 92.** Mishra B B, Gundra U M, Teale J M (2009). Toll-like receptors in CNS

parasitic infections. *Curr Trop Microbiol Immunol* 336: 83-104;

93. Mozzachiodi, R. And Byrne, J.H. (2010). More than synaptic plasticity: role of nonsynaptic plasticity in learning and memory. *Trends Neurosci.* 33, 17–26;

94. Nadel L, Hupbach A, Gomez R, Newman-Smith K (2012). Memory formation, consolidation and transformation. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 36: 1640-1645;

95. Nebl T, De Veer M J, Schofield L (2005). Stimulation of innate immune responses by malarial glycopogosphatidylinositol via pattern recognition receptors. *Parasitology* 130: 45-62;

96. Newbold C, Craig A, Kyes S, Rowe A, Fernandez-Reyes D, Fagan T (1999). Cytoadherence, pathogenesis and infected red cell surface in *Plasmodium falciparum*. *Int J Parasitol* 29, 927-937;

97. Newton CR, Krishna S 1998 Severe falciparum malaria in children: current understanding of pathophysiology and supportive treatment. *Pharmacol Ther* 79:1–53;

98. Noble W, Garwood C J, Hanger D P (2009). Minocycline as a potential therapeutic agent in neurodegenerative disorders characterized by protein misfolding. *Prion* 3: 78-83;

99. Noeypatimanond S, Malikul S, Benjapong W, Duriyananda D, Ungkasrithongkul M. Treatment of *Plasmodium falciparum* malaria with a combination of amodiaquine and tetracycline in Central Thailand. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1983; 77: 338–40.

100. Norden D M, Godbout J P (2013). Review: microglia of the aged brain: primed to be activated and resistant to regulation. *Neuropathol Appl Neurobiol*, v. 39, n. 1, p. 19-34, Feb 2013. ISSN 1365-2990 (Electronic);

- 101.** Okere CO, Kaba H (2000) Heterogenous immunohistochemical expression of microglia-specific ionized calcium binding adaptor protein (IBA1) in the mouse olfactory bulb. *Brain Res* 877:85–90;
- 102.** Ong P K, Melchior B, Martins Y C, Hofer A, Orjuela-Sánchez P, Cabrales P, Zanini G M, Frangos J M, Carvalho L J M (2013). Nitric Oxide Synthase Dysfunction Contributes to Impaired Cerebroarteriolar Reactivity in Experimental Cerebral Malaria *plos Pathog*, 9(6): e1003444;
- 103.** Pacher P, Szabó C (2007). Role of poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) in cardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors. *Cardiovasc Drug Rev* 25(3): 235-60;
- 104.** Paolicelli R C, et al (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science*, v. 333, n. 6048, p. 1456-8, Sep 9 2011. ISSN 1095-9203;
- 105.** Paolicelli R C, Bisht K, Tremblay M-E (2014). Fractalkine regulation of microglial physiology and consequences on the brain and behavior. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8, Article 129;
- 106.** Patterson, S.L., 2015. Immune dysregulation and cognitive vulnerability in the aging brain: interactions of microglia, IL-1beta, BDNF and synaptic plasticity. *Neuropharmacology* 96, 11–18;
- 107.** Penky M, Wilhelmsson U, Pekna M (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett* 565: 30-38;
- 108.** Percário S, Moreira D R, Gomes B A Q, Ferreira M E S, Gonçalves A C M, Laurindo P S O C, Vilhena T C, Dolabela M F, Green M D (2012). Oxidative Stress in Malaria. *Int. J. Mol. Sci*, 13, 16346-16372;
- 109.** Peyssonnaud C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis E A, Gallo

R L, Hurtado-Ziola N, Nizet V, Johnson R S (2005). HIF-1 α expression. Regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest* 115: 1806-1815;

110. Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D (2003). Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci.* 1010:582-586;

111. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci* 2007; 27: 10714–10721;

112. Ponsford, M. J., et al., (2012). Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J. Infect. Dis.* 205, 663-671. Doi: 10.1093/infdis/jir812;

113. R. M. Ransohoff, “How neuroinflammation contributes to neurodegeneration,” *Science*, vol. 353, no. 6301, pp. 777–783, 2016;

114. Reis, P. A., et al (2010). Cognitive Dysfunction Is Sustained after Rescue Therapy in Experimental Cerebral Malaria, and Is Reduced by Additive Antioxidant Therapy. *Plos Pathog* 6: e1000963;

115. Reis, P. A., et al (2014). Statins Decrease Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria. *Plos Pathog* 8: e1003099;

116. Reyburn H, Mbakilwa H, Mwangi R, Mwerinde O, Olomi R, Drakeley C, Whitty CJ. Rapid diagnostic tests compared with malaria microscopy for guiding outpatient treatment of febrile illness in Tanzania: randomised trial. *BMJ* 2007; 334: 403;

117. Richards A L (1997). Tumor necrosis factor and associated cytokines in the host's response to malaria. *International Journal for Parasitology* 27: 1251-1263;

118. Rockett K A, Awbum M M, Cowden W B, Clark I A (1991). Killing of *Plasmodium falciparum* in vitro by nitric oxide derivatives. *Infect Immun* 59: 3280-3283;

- 119.** Rosenbaum J T, et al (1998). Cytokines. An overview. *Adv Exp Med Biol*, 438: 441-446;
- 120.** Rosenthal, P.J. 2008. Artesunate for the treatment of severe falciparum malaria. *N Engl J Med*. 358:1829-1836;
- 121.** Samuel C. Wassmer et al., 2015. Investigating the pathogenesis of severe malaria: a multidisciplinary and cross-geographical approach. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 93: 42-56;
- 122.** Schnydrig, S., Korner, L., Landweer, S., Ernst, B., Walker, G., Otten, U., Kunz, D., 2007. Peripheral lipopolysaccharide administration transiently affect expression of brain-derived neurotrophic factor, corticotropin and proopiomelanocortin in mouse brain. *Neurosci. Lett*. 429, 69–73;
- 123.** Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (MS) (2015). Boletim epidemiológico. Volume 46, Nº 25 – 2015;
- 124.** Sheridan G K, Murphy K J (2013). Neuron-glia crosstalk in health and disease: fractalkine and CX3CR1 take centre stage. *Open Biol* 3: 130181;
- 125.** Shikani H J, Freeman B D, Lisanti M P, Weiss L M, Tanowitz H B, Desruisseaux M S (2012). Cerebral Malaria We Have Come a Long Way. *The American Journal of Pathology*, Vol. 181: 1484-1492, No. 5, 2012;
- 126.** Sierra, A. Et al (2010). Microglia shape adult hippocampal neurogenesis through apoptosis-coupled phagocytosis. *Cell Stem Cell*, v. 7, n. 4, p. 483-95, Oct 8 2010. ISSN 1875-9777;
- 127.** Squire LR. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. *Psychol Rev* 99: 195–231, 1992;
- 128.** Stoltenburg-Didinger G, Neifer S, Bienzle U, Eling WM, Kremsner PG. Selective damage of hippocampal neurons in murine cerebral malaria prevented by

pentoxifylline. *J Neurol Sci* 1993; 114:20–4. [pubmed: 8433093];

129. Storm, J., Craig, A. G., (2014). Pathogenesis of Cerebral Malaria – Inflammation and Cytoadherence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. Volume 4, Article 100. Doi: 10.3389/fcimb.2014.00100;

130. Streit W J (2004). Microglia and Alzheimer's disease pathogenesis. *J Neurosci Res*, v. 77, n. 1, p. 1-8, Jul 1 2004. ISSN 0360-4012;

131. Streit W J, Walter S A, Pennell N A (1999). Reactive microgliosis. *Prog Neurobiol*, v. 57, n. 6, p. 563-81, Apr 1999. ISSN 0301-0082;

132. Suh, K.N., K.C. Kain, and J.S. Keystone. 2004. Malaria. *CMAJ*. 170:1693-1702;

133. Szabó C, Ischiropoulos H, Radi R (2007). Peroxynitrite: biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. *Nature Reviews/Drug Discovery* 6:8;

134. Takeda N, O’Dea E L, Doedens A, Kim J, Weidemann A, Stockmann C, Asagiri M, Simon M C, Hoffmann A, Johnson R S (2016). Differential activation and antagonistic function of HIF- α isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes & Development* 24:491-501;

135. Tangpukdee N., Duangdee C., Wilairatana P. And Krudsood S. Malaria Diagnosis: A Brief Review. *Korean J Parasitol*. Vol. 47, No. 2: 93-102, June 2009 DOI: 103347/kjp.2009.47.2.93;

136. Taoufiq Z, Pino P, Dugas N, Conti M, Tefit M, Mazier D, Vouldoukis I (2006). Transient supplementation of superoxide dismutase protects endothelial cells against *Plasmodium falciparum*-induced oxidative stress. *Molecular and Biochemical Parasitology* 150: 166-173;

137. TDR. Global Report for research on infectious diseases of poverty (2012);

138. Tikka T, Fiebich B L, Goldsteins G, Keinänen R, Koistinaho J (2001).

Minocycline, a tetracycline derivative, is neuroprotective against excitotoxicity by inhibiting activation and proliferation of microglia. *The Journal of Neuroscience*, 21(8): 2580-2588;

139. Turner G D et al (1994). An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intracellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. *Am J Pathol* 145:1057;

140. Tuteja R (2007). Malaria – an overview. *FEBS Journal* 274: 4670-4679;

141. Van der Heyde, H.C; J. Nolan, V. Combes, I.Gramaglia and G.E. Grau (2006). A unified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and homeostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends Parasitol.* 22:503-508;

142. Viviani B, et al (2004). Cytokines role in neurodegenerative events. *Toxicol Lett*, 149: 85-9;

143. Viviani B, Gardoni F, Marinovich M (2007). Cytokines and neuronal ion channels in health and disease. *Int Rev Neurobiol*, 82: 247-263;

144. Vo TK, Bigot P, Gazin P, Sinou V, De Pina JJ, Huynh DC, Fumoux F, Parzy D. Evaluation of a real-time PCR assay for malaria diagnosis in patients from Vietnam and in returned travelers. *Trans R Soc Trop Med* 2007; 101: 422-428;

145. Wake H, Moorhouse A J, Nabekura J (2011). Functions of microglia in the central nervous system--beyond the immune response. *Neuron Glia Biol*, v. 7, n. 1, p. 47-53, Feb 2011. ISSN 1741-0533;

146. Weickert C S, Hyde T M, Lipska B K, Herman M M, Weinberger D R, Kleinman J E (2003). Reduced brain-derived neurotrophic factor in prefrontal cortex of patients with schizophrenia, *Molecular Psychiatry* 8: 592–610.

147. Yang Z, Ming X F (2014). Functions of arginase isoforms in macrophage

inflammatory responses: impact on cardiovascular diseases and metabolic disorders.

Frontiers in Immunology (5), Article 533;