

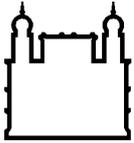
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

INTERVENÇÕES BASEADAS NA RESTAURAÇÃO DA FUNÇÃO
VASCULAR COMO TERAPIAS ADJUVANTES PARA MALÁRIA
CEREBRAL EXPERIMENTAL

ALINE DA SILVA MOREIRA

Rio de Janeiro
Dezembro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

ALINE DA SILVA MOREIRA

Intervenções baseadas na restauração da função vascular como terapias adjuvantes para malária cerebral experimental

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

Orientador: Prof. Dr. Leonardo José de Moura Carvalho

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2019

Moreira, Aline da Silva.

Intervenções baseadas na restauração da função vascular como terapias adjuvantes para malária cerebral experimental / Aline da Silva Moreira. - Rio de Janeiro, 2019.

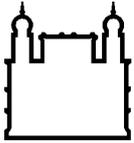
xviii, 129 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2019.

Orientador: Leonardo José de Moura Carvalho.

Bibliografia: f. 92-102

1. Malária cerebral experimental. 2. Disfunção vascular. 3. Ácido araquidônico. 4. Óxido nítrico. 5. Terapias adjuvantes. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: ALINE DA SILVA MOREIRA

**Intervenções baseadas na restauração da função vascular como terapias
adjuvantes para malária cerebral experimental**

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leonardo José de Moura Carvalho

Aprovada em: 12/12/2019

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Josué da Costa Lima Júnior - Presidente (IOC-FIOCRUZ)
Profa. Dra. Tatiana Maron Gutierrez (IOC-FIOCRUZ)
Profa. Dra. Ana Acacia Pinheiro Caruso Neves (UFRJ-RJ)
Profa. Dra. Mariana Conceição de Souza (Farmanguinhos-FIOCRUZ)
Prof. Dr. David do Carmo Malvar (UFRRJ-RJ)

Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2019



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Aline da Silva Moreira**, sob orientação do Dr. Leonardo José de Moura Carvalho. Ao décimo segundo dia do mês de dezembro de dois mil e dezenove, realizou-se às nove horas, no Auditório Maria Deane - Pavilhão Leonidas Deane, o exame da tese de doutorado intitulada: **“Intervenções baseadas na restauração da função vascular como terapias adjuvantes para malária cerebral experimental”**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Patologia e Patogenia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Josué da Costa Lima Junior - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Tatiana Maron Gutierrez - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Ana Acacia Pinheiro Caruso Neves - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr^a. Mariana Conceição De Souza – FIOCRUZ/RJ e Dr. David do Carmo Malvar – UFRRJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela Aprovação da defesa da tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 12 de dezembro de 2019.

Dr. Josué da Costa Lima Junior (Presidente da Banca):

Dr^a. Tatiana Maron Gutierrez (Membro da Banca):

Dr^a. Ana Acacia Pinheiro Caruso Neves (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por guiar os meus passos e cuidar de mim, mesmo quando a dureza da vida, às vezes, me faz pensar o contrário.

Agradeço imensamente à minha mãe, Tânia, por todo o amor, carinho e cuidado. Obrigada por apoiar todas as minhas escolhas, por ser tão presente, por me incentivar e acreditar em mim. Nem o espaço de toda essa tese seria suficiente pra descrever a sua importância em minha vida! Te admiro muito e tenho orgulho de ser a sua filha!

Agradeço à minha irmã, Amanda, por me ouvir tão pacientemente, por me compreender e aconselhar. Obrigada por me fazer rir das situações adversas da vida e por sempre estar disposta a me ajudar.

Agradeço ao meu pai, Luiz, pelas orações, pelo carinho e incentivo mesmo que distante.

Ao meu padrasto, José Carlos, pelo carinho, preocupação, e pelas caronas de madrugada nos últimos meses para que eu chegasse em segurança na Fiocruz e não perdesse os meus experimentos.

Ao meu noivo, Thiago, por todo o amor e pelo imensurável cuidado. Agradeço por compreender a minha ausência, por toda a sua paciência, companheirismo e apoio incondicional. Obrigada por me ajudar nas inúmeras vezes que tive que formatar essa tese e por me fortalecer nos momentos de exaustão.

Ao meu querido orientador, Dr. Leonardo Carvalho, pelas inúmeras oportunidades, por todos os ensinamentos, pela confiança, e incentivo constante durante esses 7 anos. Obrigada por me ouvir com tanto carinho e paciência, especialmente nos últimos meses, e pelos valiosos conselhos. Agradeço por ter tido a oportunidade de trabalhar contigo, e de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Você é um exemplo pra mim. Muito obrigada por tudo!

Aos colegas do Laboratório de Pesquisa em Malária pela disponibilidade em ajudar, pela torcida e pelos momentos de descontração. Gostaria de agradecer, especialmente, à Fabiana Gomes pela amizade, pela preocupação e pela ajuda na realização dos experimentos finais dessa tese. Obrigada, Fabi, por não me deixar esmorecer pelas dificuldades que surgem durante a caminhada. Agradeço também

ao Bruno Vasconcelos por me ajudar nos experimentos e pelo carinho. Espero que tenha muito sucesso na carreira que decidir seguir!

Ao Guilherme Salgado, meu primeiro aluno, por me permitir descobrir o que é orientar. Agradeço por me auxiliar nos experimentos e por me fazer rir às 5h da manhã a caminho do biotério. Sinto-me orgulhosa por suas conquistas e estou certa que terá um futuro brilhante pela frente.

Às minhas queridas amigas, Amanda Cruz, Manoelli Santos, Elza Silva, Marina Tristão, Raquel Rangel e Juliana Ribeiro por serem sempre presentes na minha vida. Obrigada por cada conselho carinhoso e por todo o cuidado. Agradeço por cada ligação e mensagem quando estive nos Estados Unidos, por me incentivarem a enfrentar o desconhecido, por compreenderem os meus medos e me estimularem a seguir em frente. Obrigada por me aceitarem do jeito que sou, pela torcida constante e amizade sincera!

Agradeço ao Dr. David Malvar que tão gentilmente se disponibilizou a nos ajudar com a extração e quantificação dos eicosanoides no tecido cerebral dos camundongos. Obrigada por esclarecer todas as nossas dúvidas e, pacientemente, nos auxiliar a estabelecer o melhor protocolo pra conduzir os experimentos. Muito obrigada, David!

Agradeço à Dra. Patrícia Reis e à sua aluna, Tathiany Igreja, pelo auxílio nos experimentos de comportamento animal realizados no início desse trabalho.

Ao Dr. Hans Ackerman e toda a sua equipe, Steven Brooks, Majed Almashjary, Dra. Parker Ruhl, Mary Jackson, Robert Emeh, Jessica Nino, Jarrett Jackson e Dongying Ma, pela receptividade no *Laboratory of Malaria and Vector Research* (LMVR-NIAID/NIH). De maneira especial, gostaria de agradecer ao Dr. Ackerman pela valiosa oportunidade, pelas discussões, pelo aprendizado, e pelo nítido entusiasmo com cada resultado obtido durante os experimentos. Agradeço ao Steve por me ensinar a técnica de miografia, por realizar comigo os experimentos de DAF-2, e por me alegrar com seu jeito irreverente de ser. Ao Majed por se empenhar em nos levar pra almoçar em restaurantes diferentes todos os últimos dias em que estive no LMVR (sempre com muito carinho me explicando quão *spicy* era um prato específico...rs), e por me ensinar que tudo nessa vida passa, as coisas boas, mas as ruins também. Meu coração se enche de gratidão, alegria e amor quando penso em cada um de vocês. Obrigada por tudo e por tanto!

Ao Dr. Claudio Tadeu Daniel-Ribeiro, chefe do Laboratório de Pesquisa em Malária, e à Dra. Maria de Fátima Ferreira da Cruz pela carinhosa acolhida no laboratório e por acreditarem no projeto.

Ao Dr. Eduardo Vera Tibiriçá, chefe do Laboratório de Investigação Cardiovascular, por aceitar colaborar conosco. Agradeço também à Dra. Vanessa Estato por ter me ensinado a avaliar o fluxo sanguíneo cerebral nos animais pela técnica de *Laser speckle* mas, principalmente, por todo o apoio, carinho, incentivo e força que me deu desde que ingressei no mestrado.

Ao Dr. Josué Lima por aceitar tão prontamente o convite para fazer a revisão deste trabalho e para presidir a banca examinadora da tese. Agradeço também pela valorosa contribuição que deu a este projeto durante as discussões nos seminários discentes.

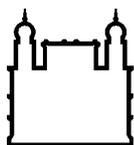
À Dra. Tatiana Maron, à Dra. Ana Acacia Pinheiro, à Dra. Mariana Souza e ao Dr. David Malvar por aceitarem tão gentilmente o convite para compor a banca examinadora dessa tese.

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária (IOC-FIOCRUZ) e, especialmente, à Rita Gomes por toda a dedicação e auxílio a nós, alunos. Obrigada, Rita, pela paciência e carinho.

À equipe do biotério do Pavilhão Helio e Peggy Pereira (HPP) por serem tão atenciosos e pelo suporte durante os experimentos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Àqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

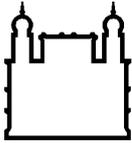
Intervenções baseadas na restauração da função vascular como terapias adjuvantes para malária cerebral experimental

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Aline da Silva Moreira

A malária cerebral (MC) é uma das complicações mais graves e letais da infecção por *Plasmodium falciparum*. O principal tratamento para a MC é o artesunato por via intravenosa, mesmo assim, 15-25% dos pacientes tratados ainda morrem. A disfunção vascular, com vasoconstrição, leva a diminuição no fluxo sanguíneo cerebral, isquemia, hipóxia tecidual e morte na MC. O óxido nítrico (NO) e metabólitos do ácido araquidônico (AA) são importantes reguladores fisiológicos do fluxo sanguíneo cerebral por suas propriedades vasodilatadoras e vasoconstritoras. Utilizando a técnica de *laser speckle* com contraste de imagem nós mostramos aqui que animais infectados por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) que desenvolveram malária cerebral experimental (MCE) apresentaram marcante diminuição no fluxo sanguíneo cerebral e que a administração de L-arginina em combinação com artesunato induziu imediata reversão na isquemia cerebral a curto prazo (1 hora), mas o efeito retrocedeu 3 e 6 horas após o tratamento. O aumento no fluxo sanguíneo cerebral, mesmo que transiente, foi associado a aumentada sobrevida desses animais. L-arginina mais artesunato não foi capaz de reverter a quebra da barreira hematoencefálica presente em animais MCE. Camundongos com MCE apresentaram maior produção de metabólitos do AA com um perfil vasoconstritor, com níveis aumentados de 8-isoprostanos, 20-HETE, 14,15-DHET e níveis diminuídos de 14,15-EET, enquanto camundongos infectados por *Plasmodium berghei* NK65, uma cepa que não causa MC, mostraram um perfil vasodilatador, com níveis normais de 20-HETE e 14,15-DHET e aumento das concentrações de PGE₂. O tratamento de animais que desenvolveram MCE com HET0016 e ozagrel diminuiu as concentrações cerebrais de 20-HETE e 8-isoprostanos, respectivamente. Apesar dos níveis de TXA₂ não estarem aumentados em animais com MCE, o tratamento com ozagrel diminuiu a produção desse eicosanoide vasoconstritor no cérebro e aumentou a sobrevida de animais com MCE quando combinado com artesunato. Assim como L-arginina, ozagrel não reverteu a quebra da barreira hematoencefálica na dose testada. A produção de PGE₂ no cérebro de animais com MCE não aumentou após tratamento com ozagrel. Utilizando um sistema de miografia pressurizado nós observamos que as artérias cerebrais de animais com MCE apresentaram resposta vasodilatadora dependente (estímulo com metacolina) de endotélio, bem como resposta vasoconstritora à serotonina, semelhante a resposta de artérias cerebrais de animais controles não infectados. Além disso, utilizando ensaio DAF-2 para avaliar a produção de NO, nós observamos que a produção de NO induzida por metacolina foi semelhante em artérias cerebrais oriundas de animais controles e de animais com MCE. Surpreendentemente, ao incubar artérias cerebrais de animais com MCE e de animais controles em plasma de animais com MCE, nós observamos que o plasma por si só aumentou a produção basal de NO pelas artérias de ambos os grupos. Esses resultados mostram que a disfunção vascular observada na MCE não é intrínseca do vaso já que a vasorreatividade e a produção de NO estão preservadas nas artérias cerebrais de animais com MCE, mas pode estar relacionada a um fator tecidual. Metabólitos do AA podem desempenhar um papel na disfunção cerebrovascular e a inibição da produção de eicosanoides vasoconstritores pode ser benéfica em animais com MC.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTERVENTIONS BASED ON RESTORATION OF VASCULAR FUNCTION AS ADJUNCTIVE THERAPIES FOR EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA

ABSTRACT

PHD THESIS IN BIOLOGIA PARASITÁRIA

Aline da Silva Moreira

Cerebral malaria (CM) is one of the most severe and lethal complications of *Plasmodium falciparum* infection. The main treatment for CM is intravenous artesunate, nevertheless 15-25% of treated patients still die. Vascular dysfunction with vasoconstriction leads to decreased cerebral blood flow, ischemia, tissue hypoxia and death in CM. Nitric oxide (NO) and arachidonic acid (AA) metabolites are important physiological regulators of cerebral blood flow through vasodilatory and vasoconstrictor properties. Using laser speckle contrast imaging (LSCI) we show here that animals infected with *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) that developed experimental cerebral malaria (ECM) showed marked decrease in cerebral blood flow and that administration of L-arginine in combination with artesunate induced immediate reversal in short-term cerebral ischemia (1 hour), but the effect receded 3 and 6 hours after treatment. Increased cerebral blood flow, even if transient, was associated with increased survival of these animals. L-arginine plus artesunate was not able to reverse the blood-brain barrier breakdown present in ECM animals. ECM mice showed higher production of AA metabolites with a vasoconstrictor profile, with increased levels of 8-isoprostanes, 20-HETE, 14,15-DHET and decreased levels of 14,15-EET, while *Plasmodium berghei* NK65-infected mice, a strain that does not cause CM showed a vasodilator profile, with normal 20-HETE and 14,15-DHET levels and increased PGE₂ concentrations. Treatment of animals that developed ECM with HET0016 and ozagrel decreased brain concentrations of 20-HETE and 8-isoprostanes, respectively. Although TXA₂ levels were not increased in animals with ECM, treatment with ozagrel decreased the brain levels of this vasoconstrictor eicosanoid and increased survival of animals with ECM when combined with artesunate. Like L-arginine, ozagrel did not reverse the blood-brain barrier breakdown at the dose tested. PGE₂ production in the brain of ECM animals did not increase after ozagrel treatment. Using a pressurized myography system we observed that the cerebral arteries of animals with ECM showed endothelium-dependent vasodilatory response (methacholine stimulation) as well as vasoconstrictor response to serotonin, similar to the cerebral arteries response of uninfected control animals. In addition, using the DAF-2 assay to evaluate NO production, we observed that methacholine-induced NO production was similar in cerebral arteries from control animals and animals with ECM. Surprisingly, by incubating cerebral arteries of ECM animals and control animals with plasma of ECM animals, we observed that plasma alone increased the basal NO production by the arteries of both groups. These results show that vascular dysfunction observed in ECM is not intrinsic to the vessel since vasoreactivity and NO production were preserved in the cerebral arteries of animals with ECM, but may be related to a tissue factor. AA metabolites may play a role in cerebrovascular dysfunction and inhibition of vasoconstrictor eicosanoid production may be beneficial in animals with CM.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Malária: Aspectos gerais	1
1.2 Malária cerebral	3
1.2.1 O papel da L-arginina e do óxido nítrico na malária cerebral	6
1.2.2 O papel do ácido araquidônico na malária cerebral	8
1.2.3 O controle do fluxo sanguíneo cerebral pelos eicosanoides e NO	12
1.2.4 Modelo experimental de malária cerebral.....	18
1.3 Justificativa	25
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Animais	27
3.2 Parasito e infecção dos animais	27
3.3 Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral	28
3.4 Ensaio de sobrevivência	30
3.5 Análise de permeabilidade da barreira hematoencefálica	31
3.6 Medida dos níveis de eicosanoides e GMP cíclico no cérebro por ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – ELISA)	32
3.6.1 Coleta e preparo das amostras para quantificação dos eicosanoides	33
3.6.2 Coleta e preparo das amostras para quantificação de GMP cíclico (GMPc)	34
3.6.3 Determinação das concentrações de eicosanoides e GMPc no cérebro por ensaio imunoenzimático (<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – ELISA)	34

3.7	Avaliação ex vivo da reatividade vascular	35
3.7.1	Coleta da artéria cerebral média (middle cerebral artery – MCA).....	35
3.7.2	Medida da reatividade vascular em MCA isolada.....	36
3.8	Avaliação ex vivo da produção de NO	37
3.8.1	Coleta das artérias cerebrais.....	37
3.8.2	Produção de NO por artérias cerebrais incubadas em tampão KH.....	38
3.8.3	Produção de NO por artérias cerebrais incubadas em plasma	38
3.9	Análise estatística	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Perfil da infecção por <i>Plasmodium berghei</i> ANKA (PbA)	41
4.2	Animais com MCE apresentam queda acentuada de fluxo sanguíneo cerebral	41
4.3	Efeito da terapia adjuvante com L-arginina sobre a MCE	43
4.3.1	L-arginina induz aumento transiente de fluxo sanguíneo cerebral em associação com artesunato	43
4.3.2	Terapia adjuvante com L-arginina não afeta a permeabilidade da barreira hematoencefálica em animais com MCE	44
4.3.3	Determinação dos níveis de GMPc no tecido cerebral....	47
4.3.4	Terapia adjuvante com L-arginina aumenta a sobrevivência de animais com MCE.....	48
4.3.5	Efeito da terapia adjuvante com o composto híbrido ART-NONO em animais com MCE.....	51
4.4	Efeito da terapia adjuvante com ozagrel sobre a MCE	56
4.4.1	Administração de ozagrel depleta tromboxano A ₂ (TXA ₂) no cérebro de animais com MCE	56
4.4.2	Terapia adjuvante com ozagrel não afeta a permeabilidade da barreira hematoencefálica em animais com MCE	57
4.4.3	Efeito da terapia adjuvante com ozagrel na sobrevivência de animais com MCE.....	60

4.5	Determinação dos níveis de eicosanoides no tecido cerebral ..	63
4.6	Avaliação <i>ex vivo</i> da reatividade vascular.....	70
4.7	Avaliação <i>ex vivo</i> da produção de NO em artérias cerebrais na MCE.....	74
5	DISCUSSÃO	77
6	PERSPECTIVAS	88
7	CONCLUSÕES	90
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
9	APÊNDICES E/OU ANEXOS	103
	APÊNDICE A - ESTRUTURA QUÍMICA DAS DROGAS UTILIZADAS NESSE TRABALHO	104
	APÊNDICE B - LICENÇA CEUA	105
	APÊNDICE C - ARTIGO 1	106
	APÊNDICE D - ARTIGO 2	119

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo biológico do <i>Plasmodium falciparum</i>	3
Figura 2 - Metabolismo do AA por diferentes vias enzimáticas.	9
Figura 3 - Regulação do fluxo sanguíneo cerebral por glutamato.	15
Figura 4 - Óxido nítrico inibe a produção de mensageiros fundamentais derivados do ácido araquidônico.	16
Figura 5 - Representação esquemática das vias vasoconstritoras e vasodilatadoras potencialmente atuantes durante a MCE (ECM).	17
Figura 6 - Imagens de retinoscopia (angiografia) de um paciente com malária cerebral após injeção de fluoresceína.	20
Figura 7 - Vasos da pia-máter de camundongos infectados por <i>P. berghei</i> ANKA.	23
Figura 8 - <i>Laser Speckle</i> com Contraste de Imagem (LSCI).....	28
Figura 9 - Imagem representativa de uma microvaso canulado.....	36
Figura 10 - Fluxo sanguíneo cerebral basal de animais controles não infectados e animais com MCE.....	42
Figura 11 - Fluxo sanguíneo cerebral em camundongos com MCE tratados com artesunato mais salina ou L-arginina.	44
Figura 12 - Permeabilidade da barreira hematoencefálica, peso do cérebro e parasitemia antes e após tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina.	47
Figura 13 - Níveis de GMPc no tecido cerebral de animais com MCE após tratamento com L-arginina.	48
Figura 14 - Sobrevida cumulativa de animais com MCE submetidos a tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina.....	49
Figura 15 - Parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=55) ou artesunato mais L-arginina (n=55) no primeiro dia de tratamento.	50
Figura 16 - Progressão temporal da parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=55) ou artesunato mais L-arginina (n=55).	51
Figura 17 - Sobrevida cumulativa de animais com MCE submetidos a tratamento com artesunato ou ART-NONO.	53

Figura 18 - Parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato (n=17) ou ART-NONO (n=17) no primeiro dia de tratamento.....	54
Figura 19 - Progressão temporal da parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato (n=17) ou ART-NONO (n=17). .	55
Figura 20 - Concentrações de TXA ₂ (determinadas pela quantificação do seu derivado, TXB ₂) em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com ozagrel.....	57
Figura 21 - Permeabilidade da barreira hematoencefálica, peso do cérebro e parasitemia antes e após tratamento com artesunato mais salina ou ozagrel.	60
Figura 22 - Sobrevida cumulativa de animais com MCE submetidos a tratamento com artesunato mais salina ou ozagrel.	61
Figura 23 - Parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=8) ou artesunato mais ozagrel (n=16) no primeiro dia de tratamento.	62
Figura 24 - Progressão temporal da parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=8) ou artesunato mais ozagrel (n=16).	63
Figura 25 - Concentrações de 20-HETE em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com HET0016.....	65
Figura 26 - Concentrações de 14,15-EET em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com AUDA.....	66
Figura 27 - Concentrações de 14,15-DHET em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com AUDA.	67
Figura 28 - Concentrações de PGE ₂ em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com ozagrel.....	68
Figura 29 - Concentrações de 8- isoprostanos em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com ozagrel.	69
Figura 30 - Vasorreatividade <i>ex vivo</i> em MCAs de camundongos com MCE frente a estímulos dependentes e independentes de endotélio.	72
Figura 31 - Vasorreatividade <i>ex vivo</i> em MCAs de camundongos com MCE frente a estímulos dependentes e independentes de endotélio na presença de L-NAME.	74
Figura 32 - Produção de óxido nítrico por artérias cerebrais isoladas de animais com MCE incubadas em tampão KH e submetidas a diferentes estímulos.	75

Figura 33 - Produção de óxido nítrico por artérias cerebrais isoladas de animais com MCE incubadas em plasma de animais controles ou de animais com MCE.
..... 76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

20-HETE	Ácido 20-hidroxieicosatetraenoico
5-HT	5-hydroxytryptamine/Serotonina
AA	Ácido araquidônico
ACA	Artéria cerebral anterior
ACh	Acetilcolina
ADMA	Dimetilarginina assimétrica
Ang-1	Angiopietina-1
Ang-2	Angiopietina-2
ART	Artemisinina
ART-NO	Artemisinina-doador de NO
AS	Artesunato
BH4	Tetrahidrobiopterina
BL	Baseline
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
COX	Cicloxygenase
CSA	Sulfato de condroitina A
CSP	Proteína circunsporozoíta
CYP450	Citocromo P450
DAF-2	4,5-diaminofluoresceína
DHETs	Ácidos dihidroxieicosatrienoicos
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EETs	Ácidos epoxieicosatrienoicos
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
EPCR	Receptor endotelial de proteína C
ET-1	Endotelina-1
ETA	Etanol
FAD	Dinucleotídeo de flavina adenina
FMN	Flavina mononucleotídeo
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GFP	Proteína fluorescente verde
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico

GTP	Guanosina trifosfato
Hb	Hemoglobina
HETEs	Ácidos hidroxiieicosatetraenoicos
HPETEs	Ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICTB	Instituto de Ciências e Tecnologia em Biomodelos
IFN- γ	Interferon-gama
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
L-ARG	L-arginina
L-NAME	N ^w -nitro-L-arginine methyl ester
LOX	Lipoxigenase
LSCI	<i>Laser speckle</i> com contraste de imagem
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
MC	Malária cerebral
MCA	Artéria cerebral média
MCAO	Oclusão da artéria cerebral média
MCE	Malária cerebral experimental
MCh	Metacolina
mGLURs	Receptores metabotrópicos de glutamato
MNC	Malária não cerebral
MRI	Imageamento por ressonância magnética
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OZA	Ozagrel
PbA	<i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PbK	<i>Plasmodium berghei</i> K173
PbNK65	<i>Plasmodium berghei</i> NK65
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Artéria cerebral posterior
PEG	Polietilenoglicol

PfEMP1	Proteína 1 de membrana do eritrócito
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF ₂ α	Prostaglandina F ₂ α
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
RH-PAT	<i>Reactive hyperaemia-peripheral arterial tonometry</i>
ROI	Região de interesse
ROS	Espécies reativas de oxigênio
s.c.	Subcutâneo
SAL	Salina
sEH	Epóxido hidrolase solúvel
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Nitroprussiato de sódio
TCA	Ácido tricloroacético
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TXA ₂	Tromboxano A ₂
UPA	Unidades de perfusão arbitrárias
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1

1 INTRODUÇÃO

1.1 Malária: Aspectos gerais

A malária continua sendo importante causa de morbidade e mortalidade no mundo. Em 2018, foram registrados 228 milhões de casos da doença globalmente, dos quais 405.000 evoluíram para o óbito, sendo em sua maioria (67%) crianças menores de 5 anos de idade (*World Health Organization - WHO, 2019*). O continente africano ainda detém a maior parte dos casos (93%) e das mortes (94%) por malária (*WHO, 2019*). No Brasil, em 2017, foram confirmados 189.503 casos e 30 mortes pela doença (*WHO, 2018*). A região amazônica, composta pelos estados do Acre, Amazonas, Amapá, Maranhão, Pará, Rondônia, Mato Grosso, Roraima e Tocantins é a mais afetada pela doença, sendo responsável por 99,6% das infecções no país (*Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS, 2019*).

A malária é causada por parasitas do filo Apicomplexa, família Plasmodiidae e gênero *Plasmodium*. Atualmente seis espécies são responsáveis por causar a doença no homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium* (*WHITE et al., 2008, BRASIL et al., 2017*).

A transmissão da doença ocorre pela picada de mosquitos fêmeas durante o repasto sanguíneo. Esse mosquito pertence ao gênero *Anopheles*, ordem Diptera, família Culicidae. Existem mais de 400 espécies do anofelino e, dessas, 70 são vetores da malária (*SINKA et al., 2012*). No continente africano, a espécie mais prevalente é o *An. gambiae*, e no Brasil são *An. darlingi*, *An. albitarsis* e *An. aquasalis* (*SINKA et al., 2012, WHO, 2018*).

O ciclo de vida do *Plasmodium* é dividido em duas fases: uma fase sexuada, chamada de esporogonia, que ocorre no hospedeiro invertebrado e uma fase assexuada, chamada de esquizogonia, que ocorre no hospedeiro vertebrado. No hospedeiro vertebrado, a fase assexuada ocorre tanto no interior das hemácias (fase eritrocítica) quanto dentro do fígado (fase exoeritrocítica) (*ANTINORI et al., 2012, TALAPKO et al., 2019*). A infecção no homem se inicia quando fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles* previamente infectadas inoculam as formas esporozoítas sob a pele do hospedeiro. Essas formas podem permanecer ali mesmo na derme, migrar para os vasos linfáticos ou alcançar os vasos sanguíneos. Os esporozoítos que atingem a corrente sanguínea, migram até o fígado e invadem os hepatócitos com a

ajuda, principalmente, da proteína circunsporozoíta (CSP) que reconhece proteoglicanos de heparan sulfato expressos na superfície dos hepatócitos (COWMAN et al., 2016). Inicia-se, assim, a fase exoeritrocítica do ciclo. Uma vez que a infecção do hepatócito foi estabelecida, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos que se multiplicam dando origem aos esquizontes teciduais que posteriormente originam os merozoítos tissulares. Ainda nesta fase, formas latentes conhecidas como hipnozoítas, podem permanecer no fígado nas infecções por *P. vivax* e *P. ovale* e são, eventualmente, responsáveis por algumas das recaídas tardias que ocorrem na malária (ANTINORI et al., 2012, TANNOUS; GHANEM, 2018). Os merozoítos tissulares são liberados dos hepatócitos através de estruturas denominadas merossomos diretamente na corrente sanguínea. Essas formas, então, invadem as hemácias, iniciando a fase eritrocítica do ciclo (PRUDÊNCIO; RODRIGUEZ; MOTA, 2006, TUJETA, 2007).

Dentro das hemácias, os merozoítos dão origem aos trofozoítos que, após amadurecimento e multiplicação, geram os esquizontes que posteriormente dão origem aos merozoítos sanguíneos. A hemácia infectada se rompe e libera os merozoítos na corrente sanguínea. Estes, por sua vez, infectam novas hemácias e o ciclo eritrocítico pode ser mantido. Importante destacar aqui que é nessa fase do ciclo que ocorrem os acessos febris da doença e a periodicidade desses acessos vai variar de acordo com a espécie de plasmódio que causou a malária (COWMAN et al., 2016). Uma parte dos trofozoítos, no entanto, amadurece e dá origem aos gametócitos femininos ou masculinos. Os gametócitos são formas infectantes para o anofelino, assim, darão continuidade ao ciclo (fase sexuada) caso sejam ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo (COWMAN et al., 2016). No intestino do vetor, os macrogametócitos dão origem aos macrogametas e a exflagelação dos microgametócitos origina os microgametas. Quando macro e microgametas se fundem, dá-se a fertilização com a formação do zigoto que logo se transformará em oocineto. O oocineto, então, penetra no epitélio intestinal do anofelino e se encista transformando-se em oocisto. A esporogonia que ocorre dentro do oocisto faz com que ele aumente de tamanho até o momento em que se rompe liberando as formas esporozoítas na hemocele do vetor. Os esporozoítos migram para as glândulas salivares do anofelino e permanecem ali até que, ao alimentar-se em um outro hospedeiro vertebrado, o mosquito possa inocular essas formas infectantes e o ciclo do *Plasmodium* recomece (TUJETA et al., 2007). Um resumo do ciclo biológico do *Plasmodium falciparum* é apresentado na figura 1.

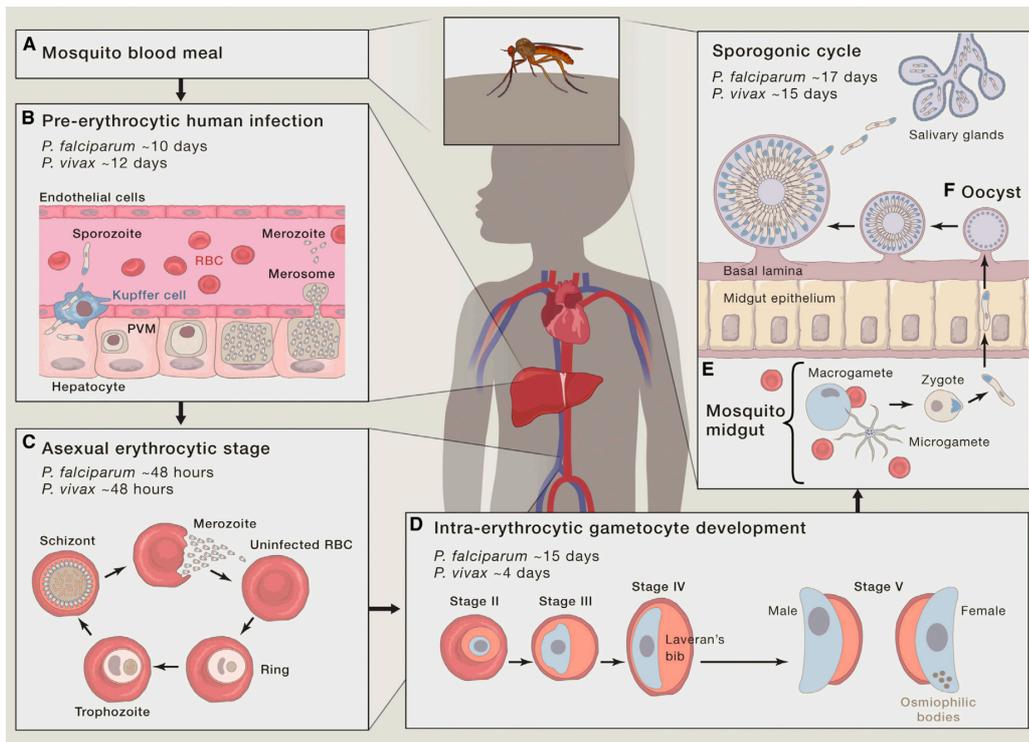


Figura 1 - Ciclo biológico do *Plasmodium falciparum*.

(A) Fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Anopheles* inoculam as formas esporozoítas na derme do hospedeiro humano. (B) As formas esporozoítas entram na vasculatura e são transportadas até o fígado. Nos hepatócitos, esporozoítas se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos, esquizontes e, então, originam os merozoítos que são liberados dos hepatócitos diretamente na corrente sanguínea por meio de estruturas denominadas merossomos. (C) As formas merozoítas invadem as hemácias, dão origem aos trofozoítos, esquizontes que, por sua vez, dão origem aos merozoítos sanguíneos. A hemácia infectada se rompe e libera essas formas merozoítas na corrente sanguínea. Os merozoítos infectam novas hemácias e o ciclo eritrocítico pode ser mantido. (D) Uma parte das formas trofozoítas dá origem a gametócitos femininos ou masculinos. (E) O anofelino, ao realizar o repasto sanguíneo em indivíduo infectado ingere, dentre outras formas do parasito, os gametócitos que darão origem aos gametas femininos (macrogametas) e gametas masculinos (microgametas) no intestino do vetor. Macro e microgametas se fundem, ocorre a fertilização e formação do zigoto. (F) O zigoto transforma-se em oocineto que penetra no epitélio intestinal do anofelino e se encista transformando-se em oocisto. O oocisto se rompe e libera as formas esporozoítas na hemocele do vetor. Os esporozoítos migram até as glândulas salivares e permanecem ali até que o mosquito faça um novo repasto sanguíneo no hospedeiro humano. COWMAN et al., 2016, p. 611.

1.2 Malária cerebral

Cerca de 1 a 2% das infecções por *Plasmodium*, por razões ainda não muito bem compreendidas, podem evoluir para as formas graves da doença (RIGGLE; MILLER; PIERCE, 2017). Uma das complicações mais graves da infecção por *Plasmodium falciparum* é a malária cerebral (MC) (WHO, 2012, STORM; CRAIG, 2014, RIGGLE; MILLER; PIERCE, 2017). Embora o número de pacientes que desenvolvem MC seja relativamente baixo, a letalidade em crianças menores de 5 anos de idade é alta. A MC é definida como uma encefalopatia aguda, difusa, caracterizada por coma persistente por mais de 30 minutos após a convulsão, com a

presença de formas assexuadas de *Plasmodium falciparum* em esfregaços de sangue periférico, com a exclusão de outras causas de encefalopatia (WHO, 2000, 2012).

As manifestações clínicas da MC podem incluir ataxia, convulsões, hemiplegia e, eventualmente, coma e morte. O tratamento preconizado pela organização mundial de saúde para os casos de MC é o artesunato por via intramuscular ou intravenosa (WHO, 2015). Mesmo após o tratamento com o antimalárico, 15-25% dos pacientes ainda morrem (STORM et al., 2019) e a maior parte desses óbitos ocorre 24h após admissão hospitalar (MAITLAND; MARSH, 2004, IDRO et al., 2005). Além disso, 5-30% das crianças que sobrevivem a MC apresentam alguma sequela neurológica, podendo incluir prejuízos motores, cognitivos ou comportamentais (BIRBECK et al., 2010, WHO, 2012, VARO et al., 2018).

Apesar de décadas de pesquisa, a patogênese da MC permanece pouco compreendida. No entanto, o que já se sabe é que ela é multifatorial, ou seja, diversos mecanismos parecem estar envolvidos no desenvolvimento desta síndrome neurológica. A resposta imune a infecção pelo *Plasmodium* e a obstrução da microvasculatura pelo sequestro de eritrócitos infectados, levando a disfunção endotelial parecem ter importante papel na MC.

Ao infectar o eritrócito, *Plasmodium* sp. passa a expressar alguns antígenos que são exportados para a membrana celular da célula vermelha parasitada. O *Plasmodium falciparum* expressa a proteína 1 de membrana do eritrócito (PfEMP1). Quando agrupadas, essas proteínas formam protuberâncias na superfície celular que são conhecidas como *knobs*. A expressão de PfEMP1 é importante na evasão do parasita do sistema de defesa do hospedeiro. Essa proteína se liga a receptores presentes em células endoteliais e, dessa forma, possibilita o sequestro do eritrócito infectado para as vênulas de importantes órgãos, impedindo a destruição da célula pelo baço (RIGGLE; MILLER; PIERCE, 2017). A ligação de PfEMP1 às superfícies celulares endoteliais também pode servir para desencadear atividade celular potencialmente prejudicial ao endotélio. O sequestro de hemácias parasitadas no endotélio vascular foi encontrado em pacientes que morreram de MC (PONGPONRATN et al., 1991, 2003). PfEMP1 é uma proteína codificada por aproximadamente 60 genes “var” e já foi demonstrado que a expressão de diferentes variantes dessa proteína parece estar relacionada a patogênese da MC (KRAEMER; SMITH, 2006, AVRIL et al., 2012, JESPERSEN et al., 2016). Durante a infecção por *P. falciparum*, o endotélio vascular torna-se ativado e passa a expressar algumas moléculas de adesão, dentre elas, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1),

molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), E-selectina, sulfato de condroitina A (CSA) e CD36. Diferentes variantes de PfEMP1 podem se ligar a diferentes receptores nas células endoteliais. ICAM-1 tem sido descrita como o principal receptor envolvido no sequestro das células infectadas nos microvasos cerebrais (TURNER et al., 1994). Outro receptor que parece ter papel fundamental no sequestro cerebral é o receptor endotelial de proteína C (EPCR). Alguns estudos têm mostrado que parasitas que expressam genes “var” que codificam PfEMP contendo domínios de ligação ao EPCR mostraram forte associação com o desenvolvimento de malária grave, incluindo MC (AVRIL et al., 2012, JESPERSEN et al., 2016, STORM et al., 2019). O sequestro e adesão de grande número de células infectadas ao endotélio vascular cerebral, através da ligação de PfEMP1 a receptores endoteliais cerebrais, pode levar a obstrução vascular. Essa obstrução pode ser ainda agravada pelas plaquetas que induzem adesão de hemácias infectadas umas as outras formando autoaglutinados (PAIN et al., 2001), por eritrócitos não infectados que formam rosetas em torno de hemácias parasitadas (DONDORP; PONGPONRATN; WHITE, 2004) e por monócitos que também são sequestrados para os vasos cerebrais (DOROVINI-ZIS et al., 2011). As consequências do sequestro são, além do bloqueio dos vasos cerebrais com consequente diminuição no fluxo sanguíneo e hipóxia tecidual, rompimento da integridade da barreira hematoencefálica, edema e hemorragia.

O desenvolvimento da MC parece também estar relacionado a hiperativação da resposta imune (GAZZINELLI et al., 2014, DUNST; KAMENA; MATUSCHEWSKI, 2017). A presença de hemácias infectadas e de material celular oriundo da ruptura dessas células parasitadas na circulação, por exemplo, a hemozoína, engatilham a resposta imune do hospedeiro. A ativação do sistema imune inato estimula os macrófagos a secretarem citocinas pró-inflamatórias, principalmente fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α). Além disso, macrófagos podem levar a liberação de interferon-gama (IFN- γ). TNF- α e IFN- γ levam a ativação das células endoteliais, ou seja, essas células passam a expressar moléculas de adesão, por exemplo, ICAM-1, facilitando o sequestro das hemácias parasitadas e engatilhando a inflamação local. Níveis elevados de TNF- α foram observados no líquido cefalorraquidiano em crianças com MC e foram associados a coma prolongado, déficits neurológicos e comprometimento cognitivo a longo prazo (SHABANI et al., 2017).

A obstrução mecânica através da adesão de hemácias infectadas à microvasculatura cerebral levando a disfunção endotelial e consequente isquemia há muito tempo é considerada o mecanismo central levando à MC. No entanto, está

ficando cada vez mais evidente que a função dos vasos sanguíneos na MC está comprometida muito além da oclusão (DESRUISSEAU et al., 2010, CARVALHO et al., 2014, EISENHUT, 2015). Constrição das arteríolas cerebrais já foi demonstrada em pacientes com MC (POLDER et al., 1991, YAMAMOTO et al., 2018). Além disso, pacientes com malária grave apresentaram menor índice de tonometria arterial periférica (*reactive hyperaemia-peripheral arterial tonometry* - RH-PAT, uma medida de vasodilatação reativa) do que pacientes controles não infectados ou pacientes com malária não complicada (YEO et al., 2007). Níveis plasmáticos de angiopoietina-1 (Ang-1) estão diminuídos e os níveis de Ang-2 estão aumentados em pacientes com malária grave, e são capazes de prever o desfecho clínico em crianças com MC (LOVEGROVE et al., 2009, CONROY et al., 2012). Os mecanismos que levam a vasoconstrição e disfunção vascular na MC ainda não são completamente entendidos, mas alguns mediadores como o óxido nítrico, principal regulador de tônus vascular, parecem estar envolvidos.

1.2.1 O papel da L-arginina e do óxido nítrico na malária cerebral

O óxido nítrico (NO) é uma pequena molécula gasosa sinalizadora que está envolvida em múltiplas funções fisiológicas em uma variedade de tipos celulares.

O NO é produzido intracelularmente através da oxidação de L-arginina pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que produz, então, NO e L-citrulina. Nos mamíferos, o NO é gerado por três diferentes isoformas da enzima NOS. NOS neuronal (nNOS ou NOS1) é constitutivamente expressa nos tecidos neuronais; NOS induzida (iNOS ou NOS2) é induzida por mediadores inflamatórios em fagócitos e células vasculares; NOS endotelial (eNOS ou NOS3) é expressa constitutivamente no endotélio e nas plaquetas (KIM et al., 2011, FORSTERMANN; SESSA, 2012). Todas as isoformas da NOS utilizam L-arginina como substrato e oxigênio e fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NADPH) como co-substratos. Diversos cofatores, incluindo tetrahidrobiopterina (BH4), dinucleotídeo de flavina adenina (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN) também são requeridos (FORSTERMANN; SESSA, 2012, PRADHAN; BERTELS; AKERMAN, 2018).

O NO atua como neurotransmissor e mediador do sistema imunológico, mas foi identificado, originalmente, como o primeiro mediador de relaxamento vascular dependente do endotélio, sendo importante, portanto, no processo de vasodilatação (IGNARRO et al., 1987). A molécula de NO promove vasodilatação, porque ao difundir-se do endotélio (onde é produzida) para o músculo liso vascular adjacente,

ativa a guanilato ciclase solúvel (GCs) que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc) que, por sua vez, promove o relaxamento das células musculares lisas (KAMPOLI et al., 2012, PRADHAN; BERTELS; AKERMAN, 2018).

Baixa disponibilidade de NO tem sido descrita em desordens hemolíticas. A hemólise excessiva depleta o sistema de remoção de hemoglobina levando ao acúmulo dessa proteína e heme no plasma que, por sua vez, irão mediar efeitos diretos pró-inflamatórios, proliferativos e pró-oxidantes nas células endoteliais vasculares. Além disso, a hemoglobina livre no plasma possui alta afinidade pelo NO, sequestrando essa molécula de maneira rápida e irreversível contribuindo, assim, para a prejudicada biodisponibilidade de NO endotelial observada nessa condição. A baixa biodisponibilidade de NO também parece estar relacionada a redução dos níveis de L-arginina, substrato para a síntese de NO pela NOS. A arginase, enzima liberada a partir da lise das hemácias, irá competir com NOS pelo mesmo substrato, L-arginina, depletando-o. Ou seja, em condições hemolíticas, ocorre diminuição nos níveis de NO tanto pelo aumentado consumo de NO pela hemoglobina livre no plasma quanto pela baixa produção da molécula pela depleção do seu precursor, a L-arginina (ROTHER et al., 2005). As consequências da baixa biodisponibilidade de NO são uma menor ativação de GCs que, por sua vez, não promove suficiente produção de GMPc. Diminuídos níveis de GMPc prejudicam a regulação do tônus do músculo liso levando a vasoconstrição local, redução do fluxo sanguíneo e prejudicada reatividade vascular a estímulos vasodilatadores. Além disso, baixos níveis de NO promovem trombose intravascular e aumentada expressão de receptores de adesão endotelial.

De fato, um estudo realizado por Yeo et al. (2009) mostrou que as concentrações de hemoglobina livre no plasma de pacientes adultos com malária grave foram maiores quando comparadas as concentrações em pacientes com malária moderadamente grave ou controles. Além disso, melhora no índice RH-PAT foi associada a diminuição nos níveis de hemoglobina livre.

A biodisponibilidade de NO está reduzida em crianças que desenvolveram MC. Um estudo realizado com crianças da Tanzânia que desenvolveram MC mostrou que os níveis plasmáticos e urinários de nitrato e nitrito (metabólitos estáveis do NO) foram inversamente correlacionados com a gravidade da doença (ANSTEY et al., 1996). Diminuídos níveis de nitrato e nitrito foram também encontrados no líquor de pacientes que desenvolveram essa síndrome neurológica (DONDORP et al., 1998).

Pacientes adultos com malária grave apresentaram disfunção endotelial caracterizada por níveis baixos de NO exalado e menor índice RH-PAT do que controles não infectados ou pacientes com malária moderadamente grave (YEO et al., 2007).

Além disso, a baixa disponibilidade de NO foi correlacionada com baixas concentrações plasmáticas de L-arginina, substrato para a síntese de NO pela NOS em crianças com MC (LOPANSRI et al., 2003). A hipoargininemia foi fortemente associada com a mortalidade. Níveis diminuídos de arginina foram observados também em amostras plasmáticas de crianças do Malawi (ALKAITS et al., 2016, GUPTA et al., 2017).

A infusão de L-arginina parece ser benéfica na malária. Pacientes adultos com malária moderadamente grave que receberam L-arginina apresentaram aumento no índice RH-PAT e nos níveis de NO exalado, ou seja, L-arginina melhorou a disfunção endotelial (YEO et al., 2007).

1.2.2 O papel do ácido araquidônico na malária cerebral

O ácido araquidônico (AA), um ácido graxo poliinsaturado de 20 carbonos, é o principal precursor dos eicosanoides e um dos constituintes básicos da membrana celular. Quando o tecido é exposto a estímulos fisiológicos ou patológicos, tais como hormônios, citocinas ou mesmo a estímulos não específicos, como dano ou injúria, a fosfolipase A₂ (PLA₂), uma enzima presente na maioria dos tipos celulares de mamíferos, atua sobre os fosfolípídeos da membrana liberando o AA.

O AA pode ser enzimaticamente metabolizado por três vias: cicloxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) e citocromo P450 dando origem a diferentes classes de eicosanoides (Figura 2). Os eicosanoides são uma família de moléculas de sinalização muito potentes, que atuam como mensageiros de curta distância, agindo sobre os tecidos próximos às células que os produzem após liberação extracelular.

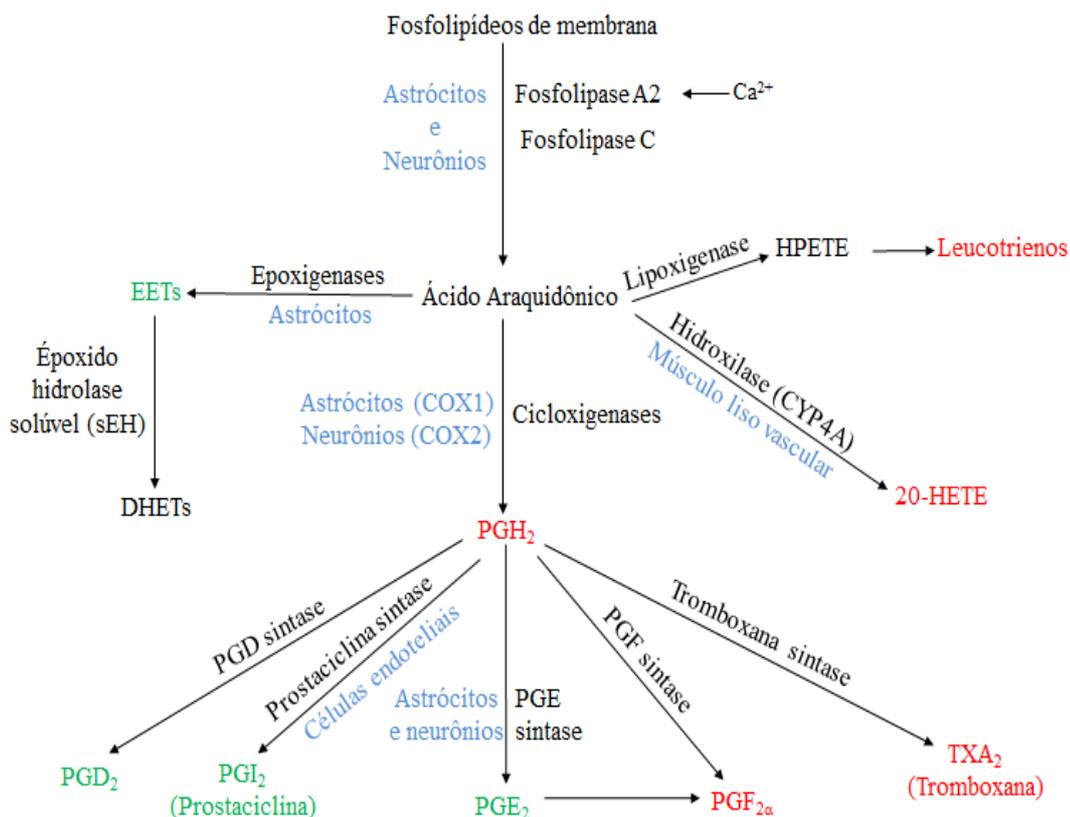


Figura 2 - Metabolismo do AA por diferentes vias enzimáticas.

O ácido araquidônico é liberado a partir dos fosfolípidios de membrana por lipases dependentes e independentes de Ca^{2+} . Os metabólitos do AA contribuem para o controle do fluxo sanguíneo cerebral. Metabólitos mostrados em verde são vasodilatadores, metabólitos em vermelhos são vasoconstritores e em azul aparece a localização de algumas enzimas relevantes. ATTWELL et al., 2010, p. 235, modificado por Aline S. Moreira.

Ao ser clivado pela ação da PLA_2 , AA é convertido a prostaglandina H_2 (PGH_2), o precursor imediato de muitas outras prostaglandinas e tromboxanos. As duas reações que levam a formação de PGH_2 são catalisadas por uma enzima bifuncional, a cicloxigenase (COX), também conhecida como Prostaglandina H_2 sintase. Na primeira das duas etapas, a atividade de cicloxigenase introduz oxigênio molecular (função oxigenase de COX) convertendo AA em prostaglandina G_2 (PGG_2). A segunda etapa, catalisada pela função peroxidase de COX, converte PGG_2 em PGH_2 , prostaglandina mais estável que PGG_2 (HARIZI; CORCUFF; GUALBE, 2008, RINK; KHANNA, 2011).

Os mamíferos têm duas isoenzimas da prostaglandina H_2 sintase, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 é uma enzima expressa constitutivamente e está envolvida na síntese de prostaglandinas relacionadas a manutenção da homeostase, por exemplo, a síntese de prostaglandinas que regulam a secreção de mucina gástrica. COX-2, uma forma induzida, estimulada, por exemplo, por citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento está mais envolvida na secreção de prostaglandinas que controlam

inflamação, dor e febre (RINK; KHANNA, 2011, MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014).

PGH2 pode ser convertida por sintases de células específicas em tromboxano A_2 (TXA_2) e 4 prostaglandinas diferentes, prostaglandina D_2 (PGD_2), prostaglandina E_2 (PGE_2), prostaglandina $F_2\alpha$ ($PGF_2\alpha$) e prostaciclina (prostaglandina I_2 , PGI_2), que são coletivamente denominados prostanóides (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014, ROJAS et al., 2018).

No trato gastrointestinal, PGE_2 , $PGF_2\alpha$ e PGI_2 protegem o fluxo da mucosa gástrica e estimulam a formação de muco, bem como a secreção de bicarbonato (WOLFE; LICHTENSTEIN; SINGH, 1999). PGD_2 , PGE_2 e PGI_2 são mediadores do tônus vascular por permitir a vasodilatação (MONCADA; VANE, 1978), enquanto TXA_2 atua como vasoconstritor nas células do músculo liso (MONCADA; VANE, 1978, NAKAHATA, 2008). $PGF_2\alpha$ e PGE_2 são responsáveis também por mediar broncoconstrição e broncodilatação no sistema respiratório, respectivamente (OREHEK et al., 1973).

Na via das LOXs, que é constituída principalmente pelas isoformas 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX, o AA é convertido em seus respectivos ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs). Diferentes LOXs produzem vários HPETEs, ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs) e outros produtos como leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LXs). 5-LOX é responsável pela síntese dos LTs e 12 e 15-LOX estão principalmente envolvidas na síntese de LXs. Enquanto LTs estão envolvidos na ativação de vias pró-inflamatórias e vasoconstrição cerebral, LXs estão envolvidas na resolução de processos inflamatórios e na vasodilatação (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014, SACERDOTI et al., 2015).

Alternativamente, o AA é metabolizado por enzimas citocromo P450 (CYP450). Estas enzimas estão localizadas em diversos órgãos, como fígado, cérebro, rins, pulmões, coração e sistema cardiovascular. Os membros da família CYP450, CYP4A e CYP4F, catalisam a ω -hidroxilação do AA a ácido 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE). Esse eicosanoide apresenta atividade pró-inflamatória e vasoconstritora. Já as enzimas CYP2C e CYP2J, metabolizam o AA a ácidos epoxieicosatrienoicos (EETs). São conhecidos 4 regioisômeros de EETs, são eles: 5,6-EET, 8,9-EET, 11,12-EET e 14,15-EET. Os EETs são metabólitos vasodilatadores, pró-fibrinolíticos, anti-inflamatórios e angiogênicos. Pouco tempo depois de serem produzidos, os EETs são hidrolisados pela enzima epóxido hidrolase solúvel (sEH) para formar seus dióis correspondentes, tais como os ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs) reduzindo,

assim, a atividade biológica dos EETs (MEIRER; STEINHILBER; PROSCHAK, 2014, IMIG, 2016, WANG et al., 2018).

A peroxidação não enzimática do AA pode levar a produção de isoprostanos. Os isoprostanos são compostos do tipo prostaglandina formados *in vivo* pela peroxidação do ácido araquidônico catalisada por radicais livres independente de COX. Isoprostanos, portanto, são importantes marcadores de estresse oxidativo. Além disso, 8-isoprostanos (F2-isoprostano), um dos isoprostanos mais bem estudados, atua como potente vasoconstritor dos capilares cerebrais por induzir a síntese de TX nas células endoteliais mediada por COX (MILNE; DAI; ROBERTS II, 2015, MORROW, 2006, PHILLIS; HORROCKS; FAROOQUI, 2006, RINK; KHANNA, 2011).

A desregulação de algum eixo dentro da via do AA pode levar a doença, e alguns trabalhos têm demonstrado que o desbalanço de alguns metabólitos dessa via pode também estar associado a MC.

Xiao et al. (1999), observaram aumentada expressão da enzima PLA₂ no baço e de COX-1 e COX-2 no cérebro de animais infectados por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) que desenvolveram malária cerebral experimental (MCE). Além disso, aumento nos níveis de LTB₄ foi reportado nos animais doentes. O tratamento posterior dos camundongos com aspirina, bloqueador da síntese das prostaglandinas pela inibição de COX-1 e COX-2, aumentou ainda mais os níveis de LTB₄ e induziu mais rapidamente o desenvolvimento da MCE. Os autores explicam que a inibição de COX pela aspirina provavelmente diminuiu os níveis de PGs. Além disso, o bloqueio dessa enzima leva a maior disponibilidade do AA que foi utilizado para geração de mais LTB₄, agravando a doença. Esses achados sugerem um efeito protetor das prostaglandinas e um efeito deletério dos leucotrienos na MCE. Esses resultados foram corroborados pelo trabalho de Ball et al., 2004. Os autores observaram aumentada expressão de COX-1 no cérebro de animais com MCE e em animais com malária não cerebral (infecção por *Plasmodium berghei* K173, PbK). No entanto, COX-2 só estava aumentada em animais com MCE. A inibição da atividade de COX-2 pelo tratamento com celecoxib foi associada ao início precoce da MC. Os dados sugerem que a indução principalmente de COX-2 e a produção de PGs podem ser protetores na doença.

De acordo com esses resultados, crianças com MC tratadas com salicilato demonstraram complicações da malária grave (acidose metabólica, hipoglicemia, morte) (ENGLISH et al., 1996).

Trabalho mais recente conduzido por Borges et al., 2017 mostrou que linhagens suscetíveis ao desenvolvimento de MCE (camundongos CBA e C57BL/6 infectados por PbA) apresentaram aumentada expressão de COX-2 e 5-LOX nos vasos cerebrais, neurônios e astrócitos sugerindo que ambas as vias desempenham um papel no desenvolvimento da MC em camundongos suscetíveis. Ao contrário, camundongos BALB/c, linhagem resistente ao desenvolvimento da MCE, apresentaram menor expressão de ambos, COX-2 e 5-LOX no cérebro, reforçando a importância da exacerbação de ambas as vias no desenvolvimento da doença cerebral.

De maneira interessante, camundongos infectados por PbA deficientes em 5-LOX apresentaram sobrevida reduzida, mas o tratamento com LXA4 preveniu a mortalidade dos animais com MCE, mostrando um papel protetor para LXA4 nessa síndrome neurológica (SHRYOCK et al., 2013). O tratamento de animais com LXA4 melhorou a disfunção endotelial que ocorre na MCE. LXA4 preveniu a quebra da barreira hematoencefálica, aumentou a densidade capilar funcional cerebral e reduziu a expressão de ICAM-1 nas células endoteliais (SOUZA et al., 2015).

Os níveis de PGE₂ foram inversamente correlacionados com a gravidade da malária humana (PERKINS; KREMSNER; WEINBERG, 2001). Corroborando os resultados de 2001, Perkins et al. (2005) observaram que o prejuízo na produção de PGE₂ foi associado aos resultados adversos em crianças com malária cerebral e níveis aumentados de PGE₂ foram observados nos casos de parasitemia assintomática.

A utilização de iloprost, um análogo sintético da prostaciclina, preveniu significativamente o desenvolvimento da MCE em animais geneticamente suscetíveis ao desenvolvimento desta síndrome neurológica (SLIWA et al., 1991).

1.2.3 O controle do fluxo sanguíneo cerebral pelos eicosanóides e NO

A integridade estrutural e funcional do cérebro depende de um contínuo fornecimento vascular de oxigênio e glicose dada a limitada reserva energética desse tecido. O sistema cerebrovascular possui vários mecanismos para garantir o adequado fluxo sanguíneo para atender as demandas específicas de energia e evitar flutuações prejudiciais devido a alterações na pressão arterial.

O mecanismo de autorregulação protege o cérebro de flutuações no fluxo sanguíneo quando a pressão arterial varia. O fluxo sanguíneo cerebral é extremamente bem autorregulado entre os limites de pressão arterial de 50 e 150

mmHg. Isto quer dizer que a pressão média pode ser diminuída para valores de 50 mmHg ou aumentadas para valores de 150 mmHg sem variação significativa do fluxo sanguíneo cerebral (MOERMAN; DE HERT, 2019).

Assim como na maioria dos outros tecidos, o fluxo sanguíneo cerebral é muito correlacionado ao metabolismo tecidual. Já se sabe que o cérebro tem uma habilidade intrínseca de rapidamente regular seu próprio fornecimento sanguíneo em resposta a demandas locais de energia, uma resposta denominada de hiperemia funcional. Essa resposta homeostática é importante para fornecer aumentada entrega de glicose e oxigênio nos momentos de atividade intensa e demanda metabólica (IADECOLA, 2017). Acredita-se que vários fatores metabólicos contribuam para a regulação do fluxo sanguíneo cerebral como: concentração de dióxido de carbono, concentração de íons hidrogênio, concentração de oxigênio e mediadores liberados pelos astrócitos, células especializadas não neuronais. No entanto, alguns trabalhos têm discutido se, de fato, sinais metabólicos (queda nas concentrações de oxigênio ou aumento nas concentrações de dióxido de carbono e hidrogênio) gerados por neurônios ativos engatilham aumento de fluxo sanguíneo cerebral. Essa ideia tem sido substituída pela descoberta da sinalização mediada por neurotransmissores, principalmente o glutamato que tem papel principal na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (ATTWELL et al., 2010, MACVICAR; NEWMAN, 2015).

A interação entre as células que compõem a unidade neurovascular, como células endoteliais, pericitos, células musculares lisas, neurônios terminais e astrócitos parece ser importante no controle do fluxo sanguíneo cerebral (FILOSA; IDDINGS, 2013). Reconhece-se agora que a própria atividade sináptica e cerebral por ela mesma leva ao aumento no fluxo sanguíneo cerebral. Número cada vez maior de evidências tem sugerido que o acoplamento entre a atividade neuronal e o fluxo sanguíneo cerebral é devido, em parte, a mediadores liberados pelos astrócitos (tais como NO e metabólitos do AA), células que revestem os vasos sanguíneos no sistema nervoso central (SNC) (ATTWELL et al., 2010, HARDER et al., 2018).

A liberação de glutamato por neurônios pré-sinápticos ativa receptores neuronais N-metil-D-aspartato (NMDA), resultando no influxo de Ca^{++} nos neurônios pós-sinápticos (Figura 3 A). O aumento de cálcio dentro dos neurônios pode ativar nNOS ou PLA_2 . Se nNOS é ativada, NO é liberado. Este NO ativa GMPc presente nas células musculares lisas das arteríolas cerebrais causando vasodilatação. Se PLA_2 é ativada, ela cliva o AA presente na membrana celular, o AA, por sua vez, é convertido a PGs pela atividade da COX-2 que, assim como NO, atuará no músculo liso dos

vasos sanguíneos cerebrais promovendo vasodilatação (ATWELL et al., 2010, PETZOLD; MURTHY, 2011, MACVICAR; NEWMAN, 2015).

O glutamato liberado após sinapse por neurônios pré-sinápticos também é capaz de ativar receptores metabotrópicos de glutamato (mGLURs) presentes nos astrócitos e levar ao aumento das concentrações de Ca^{++} intracelular (Figura 3 B). Este aumento pode levar, então, a abertura de canais de potássio nos pés dos astrócitos que liberam o K^+ . Quando liberado, o potássio atua nas células musculares lisas dos vasos promovendo vasodilatação (ATWELL et al., 2010, PETZOLD; MURTHY, 2011, MACVICAR; NEWMAN, 2015).

O aumento de Ca^{++} no astrócito, após ativação do mGLURs pelo glutamato pode ainda ativar PLA₂. A PLA₂ cliva AA e o acúmulo intracelular de AA leva a geração de seus metabólitos, PGs e EETs que serão liberados e nas células musculares lisas das arteríolas cerebrais promoverão vasodilatação. EETs podem promover vasodilatação por inibir receptores de tromboxano, um derivado vasoconstritor da via do AA. Além disso, o AA gerado através da ação de PLA₂ pode não ser metabolizado dentro do astrócito, mas nas células musculares lisas dos vasos. Nessas células, AA pode ser metabolizado por enzimas CYP4A ou CYP4F à 20-HETE, um metabólito vasoconstritor e induzir, assim, a contração vascular. Dependendo do tônus vascular prévio e das concentrações de O_2 , o aumento do Ca^{++} dentro do astrócito poderá levar a vasoconstrição ou a vasodilatação (ATWELL et al., 2010, PETZOLD; MURTHY, 2011, MACVICAR; NEWMAN, 2015).

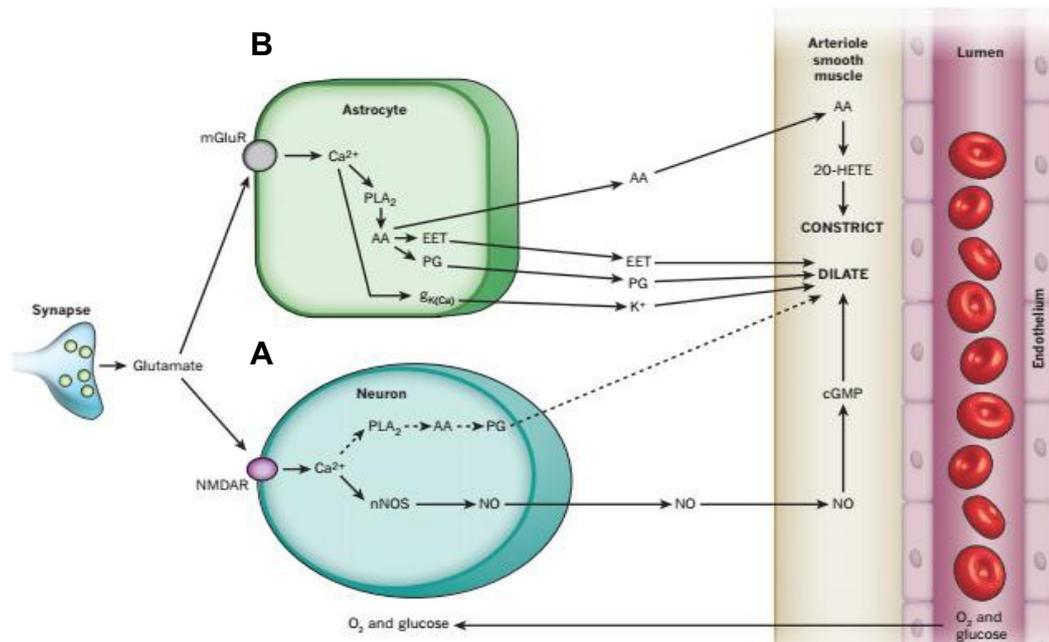


Figura 3 - Regulação do fluxo sanguíneo cerebral por glutamato.

Vias a partir de neurônios e astrócitos (esquerda) que regulam o fluxo sanguíneo por enviar mensageiros (setas) para influenciar o músculo liso em torno das arteríolas que fornecem oxigênio e glicose para as células (direita, mostrando o lúmen do vaso contornado por células endoteliais e músculo liso). **(A)** Nos neurônios pré-sinápticos, a liberação sináptica de glutamato atua nos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) presentes em neurônios pós-sinápticos, levando ao aumento nas concentrações de Ca^{2+} . Aumento nas concentrações de Ca^{2+} ativa óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) a liberar NO. O NO ativa guanilato ciclase solúvel (GCs) no músculo liso vascular que converte guanosina trifosfato (GTP) em guanosina monofosfato cíclico (GMPc). GMPc, por sua vez, promove vasodilatação. O aumento das concentrações de Ca^{2+} também pode (linhas pontilhadas) induzir a produção de ácido araquidônico (AA) a partir da ação da enzima fosfolipase A_2 (PLA_2). O AA é convertido a prostaglandinas (PGs) que dilatam os vasos. **(B)** O glutamato aumenta as concentrações de Ca^{2+} nos astrócitos por ativar os receptores metabotrópicos de glutamato (mGluR). Aumento nas concentrações de Ca^{2+} leva a produção de AA. O AA pode ser convertido a três tipos de metabólitos: Prostaglandinas e EETs que promovem vasodilatação ou dar origem a 20-HETE no músculo liso, promovendo constrição vascular. Um aumento nas concentrações de Ca^{2+} nos pés dos astrócitos pode ativar também canais de potássio ativados por Ca^{2+} de alta condutância, liberando K^+ que também induz dilatação vascular. ATTWELL et al., 2010, p. 234.

A ativação dessas vias e a interação entre elas ao promover vasodilatação cerebral aumenta a oferta de O_2 e de glicose necessária para aquelas regiões com aumentada atividade neuronal.

O NO produzido tanto pela ação de nNOS nos neurônios pós-sinápticos, quanto pela ação de eNOS nas células endoteliais dos microvasos cerebrais, pode interferir na via do AA (Figura 4). Isso se deve ao fato dessa molécula atuar como inibidor da geração de 20-HETE nas células musculares lisas das arteríolas cerebrais. Dessa forma, em situações de baixa disponibilidade de NO, 20-HETE é produzido, agravando a vasoconstrição. O NO também inibe a produção de EETs pelos astrócitos (ATTWELL et al., 2010, PETZOLD; MURTHY, 2011, MACVICAR; NEWMAN, 2015).

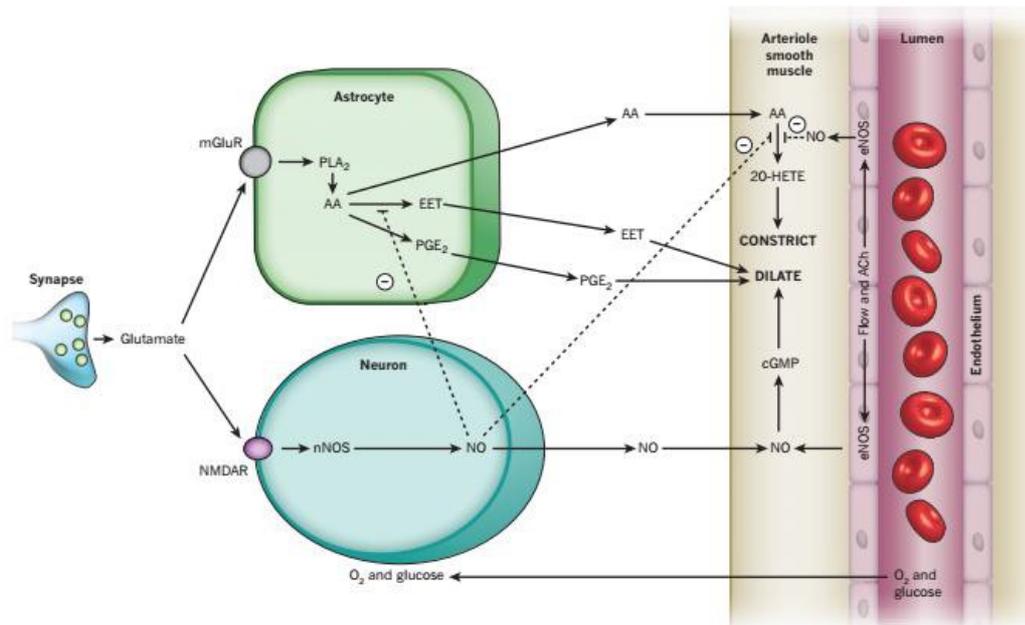


Figura 4 - Óxido nítrico inibe a produção de mensageiros fundamentais derivados do ácido araquidônico.

NO inibe (linhas pontilhadas) a produção tanto do metabólito vasoconstritor 20-HETE quanto do metabólito vasodilatador EET. NO também estimula fracamente COX-1 e inibe COX-2 (não mostrado). A óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) pode ser ativada pelo *shear stress* (força tangencial de tração produzida pela passagem de sangue ao longo da superfície luminal do endotélio vascular) induzido pelo fluxo ou por acetilcolina (ACh). ATTWELL et al., 2010, p. 236.

Processos patológicos que interfiram nos mecanismos de acoplamento neurovascular (transdução da atividade cerebral para alterações no fluxo sanguíneo) podem perturbar a manutenção do fluxo sanguíneo adequado para o cérebro. Desarranjo na geração e balanço de derivados do AA e/ou desregulação das enzimas envolvidas nas suas sínteses, podem levar a um aumento dos metabólitos vasoconstritores ou diminuição dos metabólitos vasodilatadores e, conseqüentemente, queda no fluxo sanguíneo cerebral. A manipulação farmacológica dessas vias pode ser utilizada potencialmente para corrigir tais processos. Um esquema de vias importantes atuantes na MCE pode ser observado na figura 5.

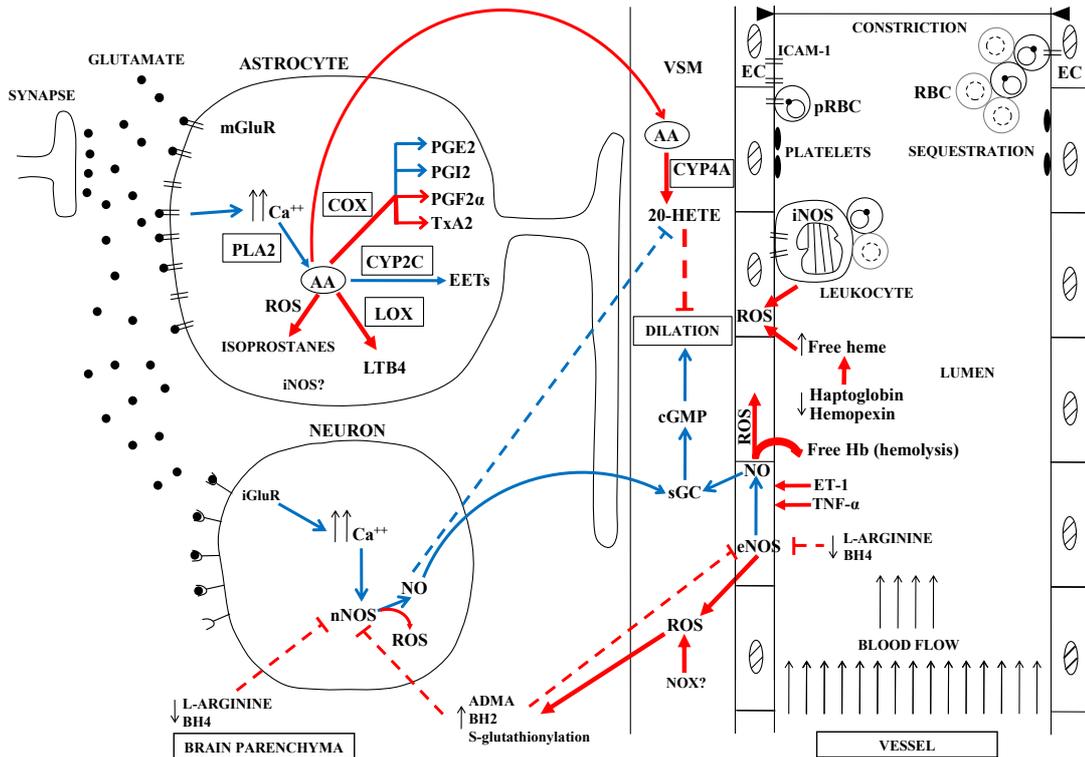


Figura 5 - Representação esquemática das vias vasoconstritoras e vasodilatadoras potencialmente atuantes durante a MCE (ECM).

Lado Luminal: A infecção leva à inflamação vascular com aumento da expressão de moléculas de adesão celular, como a ICAM-1, que atuam como receptores de células endoteliais (EC) para hemácias parasitadas (pRBC), leucócitos e plaquetas. O sequestro bloqueia as vênulas pós-capilares, diminuindo o fluxo sanguíneo e gerando hipóxia e, juntamente com a inflamação, causa disfunção endotelial, incluindo a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a regulação positiva de mediadores como TNF- α e ET-1 que contraem ativamente os vasos. A destruição das hemácias do hospedeiro (RBC) pelo parasita libera hemoglobina (Hb), que captura o NO, arginase que consome arginina e heme, cuja presença é promovida pela falta de haptoglobina e hemopexina. A hipoargininemia e a oxidação do BH4 por ROS, e o excesso de produção de dimetilarginina assimétrica (ADMA - antagonista endógena da L-arginina), causam a disfunção da eNOS, que começa a gerar mais ROS também ajudando a consumir as pequenas quantidades de NO que ainda são produzidas, gerando peroxinitrito. **Lado do parênquima cerebral:** Esses mecanismos também atuam para causar disfunção da nNOS nos neurônios, o que contribui para a baixa biodisponibilidade do NO, geração de ROS e comprometimento vascular. A infecção e a inflamação causam a regulação positiva de várias enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (AA), principalmente em astrócitos, incluindo PLA₂, COX-1 e COX-2 e possivelmente outras como LOX e CYP4A, envolvidas na geração de metabólitos vasoconstritores, que superam as vias que geram metabólitos vasodilatadores, como CYP2C e a via de COX, que levam à produção de PGE₂. O estresse oxidativo força a oxidação não enzimática do AA que gera vasoconstritores potentes, como os isoprostanos. As vias que favorecem a vasoconstrição e a vasodilatação são designadas por setas vermelhas e azuis, respectivamente. Esquema elaborado pelo Dr. Leonardo J. M. Carvalho.

Dunn et al. (2008) utilizando o rato hipertenso com propensão ao acidente vascular encefálico (SHRSPP), um modelo animal de hipertensão e disfunção endotelial, mostraram que a produção de 20-HETE, um dos mais potentes eicosanoides vasoconstritores da via do AA, está aumentada na vasculatura desses animais quando comparada a produção de 20-HETE em animais WKY normotensos. O tratamento dos animais SHRSPP com HET0016, um inibidor da CYP hidroxilase

(CYP4A e CYP4F), enzima responsável pela produção de 20-HETE, reduziu significativamente o tamanho do infarto, a formação vascular cerebral de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a disfunção vascular observada nesses animais.

Em um estudo de dano cerebral após isquemia temporária, ratos tratados com HET0016 90 minutos antes da oclusão da artéria cerebral média (*middle cerebral artery occlusion* – MCAO), mostraram 79,6% de redução nas concentrações de 20-HETE no córtex cerebral, significante redução no volume da lesão após a MCAO e atenuação da diminuição do fluxo sanguíneo cerebral mediada pela injúria nesse modelo (POLOYAC et al., 2006).

Em modelo experimental de infarto cerebral, Koumura et al. (2011) utilizaram ozagrel, um inibidor da enzima tromboxano sintase para verificar os efeitos desse fármaco no dano isquêmico induzido por oclusão da MCAO em camundongos. Os autores observaram efeito benéfico do ozagrel que diminuiu a área e o volume de infarto cerebral 24 horas após a oclusão vascular. Além disso, ozagrel melhorou o déficit cognitivo nesses animais.

Alguns trabalhos têm demonstrado o papel benéfico da inibição da enzima sEH na injúria isquêmica cerebral experimental. Dorrance et al. (2005) trataram ratos hipertensos com propensão ao acidente vascular encefálico (SHRSPP) com AUDA antes da oclusão da MCA, e observaram redução significativa no tamanho do infarto cerebral desses animais. Liu et al. (2015) mostraram que tanto a administração exógena de 14,15-EET quanto a inibição da sEH por AUDA reduziram a apoptose neuronal e o tamanho do infarto.

1.2.4 Modelo experimental de malária cerebral

Até o momento, a maior parte do nosso conhecimento sobre a malária cerebral humana foi obtida a partir de estudos de autópsia do tecido cerebral de pacientes com MC. Apesar de relevantes, a avaliação de amostras *post-mortem* para estudos histopatológicos limita-se a nos fornecer informações sobre o desfecho nos casos fatais, não nos permitindo correlacionar características patológicas com o aparecimento dos sintomas clínicos, além de não possibilitar comparações entre os casos fatais e aqueles que responderam com sucesso ao tratamento.

Estudos de neuroimagem tem acrescentado novos conhecimentos sobre processos patogênicos críticos que, ao contrário dos estudos baseados em autópsia, permitem uma observação em série ao longo do tempo e permite comparações entre casos fatais e sobreviventes. A utilização de ressonância magnética e tomografia

computadorizada, por exemplo, mostrou que o edema cerebral é o achado mais comum relacionado a patologia da MC (MOHANTY et al., 2011) e foi significativamente associado com a morte nessa síndrome neurológica (SEYDEL et al., 2015). Apesar de nos ajudar a abordar questões relacionadas a patogênese da MC, este é um recurso caro e seu uso pode apresentar preocupações éticas.

A retina é um tecido nervoso cuja microcirculação apresenta as mesmas propriedades daquelas do SNC. Os olhos servem, portanto, como uma “janela” para o cérebro permitindo uma avaliação não invasiva da imagem funcional e estrutural da microcirculação, que é o principal local de sequestro de eritrócitos infectados. De fato, quando amostras histológicas do cérebro e da retina foram comparadas em casos fatais de MC, o sequestro cerebral estava sempre associado ao sequestro na retina (LEWALLEN et al., 2000, WHITE et al., 2009). A MC está associada não somente a retinopatia que prevê o sequestro cerebral, mas também se correlaciona com a gravidade do envolvimento cerebral (WHITE et al., 2001) e com a mortalidade (BEARE et al., 2004). Além disso, na retinoscopia é possível avaliar o grau de sequestro de parasitas e defeitos de preenchimento dos vasos (BARRERA et al., 2018). Dessa forma, a avaliação da retina é capaz de fornecer informações diagnósticas bem como prognósticas da MC. Estudos de angiografia na retina após infusão de fluoresceína mostraram hipoperfusão do tecido e, em alguns casos, amplas áreas de não perfusão (Figura 6) (BEARE et al., 2009).

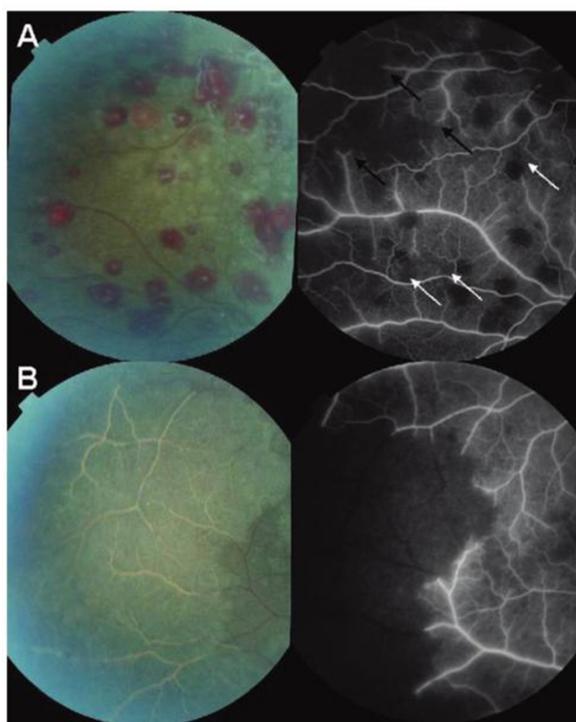


Figura 6 - Imagens de retinoscopia (angiografia) de um paciente com malária cerebral após injeção de fluoresceína.

A: Múltiplas microhemorragias, que geram áreas de não perfusão. **B:** Uma grande área de "branqueamento retinal" que, na angiografia, se revela uma extensa área de não perfusão. BEARE et al., 2009, p. 268.

Um estudo de O'Brien et al. (2018) utilizando uma outra metodologia não invasiva, o doppler transcraniano, mostrou que a MC humana não é uma síndrome única, havendo diferentes formas no que diz respeito a hemodinâmica cerebral. Os autores concluíram que os casos com vasoespasmo e com queda de fluxo sanguíneo foram os mais graves e estavam associados a maior mortalidade.

Devido às dificuldades em se estudar de forma aprofundada casos de MC em humanos e da limitada possibilidade de avaliar os processos patológicos, modelos animais têm sido utilizados para estudar a patogênese dessa síndrome neurológica. Modelos de MC *in vivo* incluem comumente primatas não humanos e roedores.

A infecção de macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) por *Plasmodium coatneyi*, modelo de primata não humano mais aceito para estudar a malária cerebral humana, leva ao desenvolvimento de complicações características da MC como o sequestro de células vermelhas infectadas na microvasculatura cerebral e a expressão de moléculas de adesão celular tais como ICAM-1, CD36, etc (AIKAWA et al., 1992). Apesar de ser um bom modelo para estudo *in vivo* de MC, a utilização de primatas não humanos é cara, restrita ao uso de baixo número de indivíduos e a falta de animais geneticamente modificados faz com que esses não sejam modelos preferidos de

malária cerebral experimental (LOU et al., 2001, LACERDA-QUEIROZ et al., 2008, CRAIG et al., 2012).

O modelo de infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) mimetiza muitos dos eventos observados durante a malária cerebral humana, sendo aceito como o melhor modelo disponível de MCE. A infecção de linhagens suscetíveis de camundongos, como C57BL/6 e CBA, leva ao desenvolvimento de uma patologia cerebral fatal, com início normalmente de 6 a 10 dias após a infecção, com sinais clínicos incluindo ataxia, paralisia, convulsões e coma (DE SOUZA; RILEY, 2002, DE SOUZA et al., 2010). Esses animais podem também apresentar prejuízos cognitivos (COMIM et al., 2012). Camundongos C57BL/6 infectados por *Plasmodium berghei* NK65 (PbNK65) não desenvolvem sinais neurológicos, morrem aproximadamente em 12 dias após a infecção e são amplamente aceitos como modelos controles da infecção de camundongos C57BL/6 por PbA. A infecção de animais C57BL/6 por PbNK65 causa a síndrome da dificuldade respiratória aguda nesse modelo, uma forma grave da malária (DE NIZ; HEUSSLER, 2018).

Camundongos BALB/c são resistentes a MCE, ou seja, não desenvolvem a síndrome neurológica após infecção por PbA e morrem cerca de 20 dias após a infecção em consequência da hiperparasitemia e anemia grave (LACERDA-QUEIROZ et al., 2008, DE NIZ; HEUSSLER, 2018).

Diversas características histopatológicas são compartilhadas entre a malária cerebral humana e experimental. Presença de hemorragia cerebral foi observada na MC e MCE, citoaderência/aglutinação/sequestro das células vermelhas infectadas devido a sua interação com o endotélio microvascular humano e murino (apesar da extensão do sequestro de hemácias infectadas nos microvasos cerebrais ser maior nos humanos), oclusão e embolização da microvasculatura cerebral, sequestro de leucócitos nos capilares cerebrais ocorre nos camundongos assim como no homem (mas a quantidade de leucócitos sequestrados é maior no modelo murino). Quebra da barreira hematoencefálica e ativação endotelial com expressão aumentada de moléculas de adesão como ICAM1, VCAM-1, E-selectina e CD36 ocorrendo na malária cerebral humana e no caso da MCE, aumentada expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (SINGH; PRAKASH, 2018, GHAZANFARI; MUELLER; HEATH, 2018). Assim como na MC humana, animais com MCE apresentam disfunção vascular, com baixa biodisponibilidade de NO, hipoargininemia e níveis elevados de hemoglobina livre no plasma (GRAMAGLIA et al., 2006). Também de forma similar, os níveis plasmáticos

de Ang-1 estão diminuídos na MCE, e a administração de Ang-1 exógena melhora o desfecho nesses animais (HIGGINS et al., 2016).

O foco de pesquisa do nosso grupo tem sido a compreensão dos mecanismos de vasoconstrição e disfunção vascular na MCE e o desenvolvimento de terapias para reverter esses processos. A utilização do modelo experimental de infecção de camundongos C57BL/6 por PbA tem nos ajudado a entender os mecanismos envolvidos na patogenia da MC.

Cabrales et al. (2010) mostraram marcante diminuição no fluxo sanguíneo cerebral em camundongos no momento da manifestação da MCE devido a reduzida velocidade das células vermelhas sanguíneas e ao processo de vasoconstrição que, eventualmente, levou ao colapso vascular (Figura 7). De forma interessante, a administração de nimodipina, um bloqueador de canal de cálcio utilizado como fármaco de escolha na prevenção de vasospasmo em pacientes com hemorragia subaracnóidea, associada ao artemeter resultou em aumento de sobrevivência de animais com MCE e melhora em diversos parâmetros cardiovasculares (CABRALES et al., 2010, MARTINS et al., 2013). A diminuição no fluxo sanguíneo na MCE foi associada com diminuído valor de hematócrito levando a hipóxia e acidose, com marcante diminuição na tensão de oxigênio nas arteríolas cerebrais, vênulas e tecido perivascular em animais com MCE (CABRALES et al., 2013).

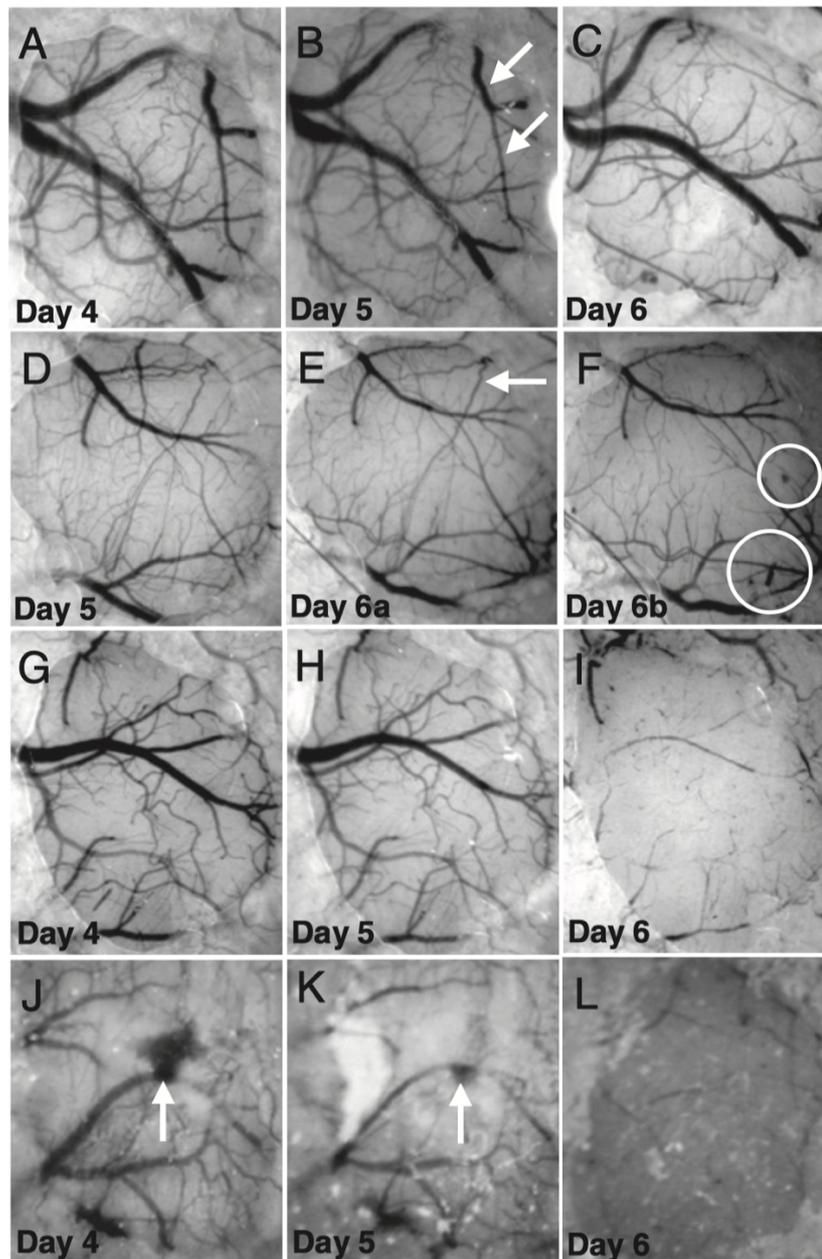


Figura 7 - Vasos da pia-máter de camundongos infectados por *P. berghei* ANKA.

Cada grupo de três imagens (por exemplo, **A-B-C**) representa fotos tiradas nos dias 4, 5 e 6 de infecção (ou seja, a terceira no dia em que os animais desenvolvem malária cerebral). As setas em **B** e **E** indicam vasos que desapareceram no dia 6. As imagens **I** e **L** mostram vasta área de não perfusão, semelhante ao observado em retinas de pacientes com malária cerebral na figura 6. No caso do último grupo de imagens (**J-K-L**), a extensa área de não perfusão foi precedida de uma hemorragia. CABRALES et al., 2010, p. 1311.

A administração de uma molécula doadora de NO (DPTA-NO), embora não tenha prevenido completamente as complicações microcirculatórias da MCE, melhorou o fluxo sanguíneo cerebral nesses animais e preveniu a vasoconstrição. O tratamento com NO exógeno também preveniu microhemorragias e diminuiu a inflamação vascular cerebral (CABRALES et al., 2011) principalmente por reduzir a expressão de moléculas de adesão como ICAM-1 e P-selectina reduzindo o acúmulo

de leucócitos e plaquetas no cérebro no sexto dia após a infecção (ZANINI et al., 2011).

A disfunção vascular que ocorre na MCE parece, portanto, estar relacionada a baixa produção de NO. Como a enzima óxido nítrico sintase é responsável pela produção da molécula de NO, nos perguntamos se NOS (isoformas eNOS e nNOS) estaria disfuncional na MCE contribuindo, assim, para o prejuízo da função vascular. Ong et al. (2013) observaram que animais com MCE, de fato, apresentaram resposta vascular prejudicada quando vasos da pia-máter foram estimulados com acetilcolina (ACh) e N-metil-D-aspartato (NMDA), que induzem vasodilatação por mecanismos dependentes das enzimas eNOS e nNOS, respectivamente. A ausência de resposta dilatadora nesses animais estava associada a uma baixa geração de NO nos vasos estimulados. Os autores sugerem que o estresse oxidativo poderia estar levando a oxidação de BH₄, cofator essencial para o funcionamento da NOS, promovendo desacoplamento da NOS e prejudicando a função da enzima. A superfusão de BH₄ nos vasos da pia reverteu parcialmente a resposta vascular à ACh e ao NMDA, sugerindo que a escassez de BH₄ pode estar implicada na disfunção da NOS.

Recentemente, Ong et al. (2018) demonstraram que a superfusão direta de L-arginina, substrato da NOS, nos vasos da pia-máter de camundongos com MCE induziu imediata vasodilatação. Além disso, a administração sistêmica de L-arginina, combinada ou não com artesunato, preveniu a piora da constrição vascular cerebral. A L-arginina, portanto, parece também ter um papel benéfico sobre a disfunção vascular que ocorre na MCE.

Bertinaria et al., (2015) desenvolveram drogas híbridas com efeito dual, ou seja, antiplasmodial e repositora de NO para restauração da homeostase vascular, com o intuito de aumentar a eficácia do tratamento da MC. Os autores demonstraram que drogas híbridas de artemisinina com doador de NO (ART-NO) mantiveram a atividade *in vitro* e *in vivo* contra *P. berghei*, as propriedades vasodilatadoras e uma das drogas testadas aumentou a sobrevivência de animais com MCE comparados a animais tratados apenas com artemeter.

Finalmente, no trabalho de mestrado mostramos que a administração sistêmica de L-arginina aumentou de forma imediata e substancial o fluxo sanguíneo cerebral de animais com MCE uma hora após a intervenção. Resultado similar foi encontrado após bloqueio farmacológico da produção do eicosanoide vasoconstritor TXA₂ utilizando ozagrel.

1.3 Justificativa

A malária cerebral (MC) é uma vasculopatia grave, e o processo isquêmico resultante do bloqueio e constrição dos vasos é um evento chave na patogenia dessa complicação e que, em última análise, acaba causando a morte do indivíduo. A compreensão dos mecanismos de disfunção vascular é crucial para o desenvolvimento racional de terapias adjuvantes que aumentem a sobrevivência e diminuam a incidência de sequelas em pacientes com MC. Nossos achados anteriores mostraram que a superfusão de L-arginina no cérebro de animais com MCE reverteu o processo vasoconstritor. Por isso, decidimos investigar os efeitos de uma terapia adjuvante de L-arginina em combinação com artesunato, o fármaco de eleição para tratar malária cerebral, sobre a sobrevivência, fluxo sanguíneo cerebral e permeabilidade da barreira hematoencefálica. Os achados com administração de ozagrel, um inibidor da tromboxano sintase, levando a aumento do fluxo sanguíneo cerebral, nos levaram a também avaliar seu desempenho como terapia adjuvante na MCE, e a avaliar mais detalhadamente os níveis de outros metabólitos vasoativos do AA nessa síndrome neurológica. Além disso, nossos dados *in vivo* mostraram que vasos da pia-máter tem deficiência de resposta a estímulos vasoativos dependentes de NOS durante a MCE, e assim buscamos em um sistema *ex vivo* avaliar se essa deficiência seria intrínseca do vaso ou derivada de fatores externos. Assim, no presente trabalho, abordamos os mecanismos envolvidos na vasoconstrição e isquemia cerebral na malária cerebral experimental (MCE) e avaliamos o efeito de intervenções destinadas a restaurar o fluxo sanguíneo cerebral adequado em animais com a síndrome neurológica. Intervenções simples e direcionadas que, caso eficazes, poderiam salvar centenas de milhares de vidas todos os anos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o efeito de intervenções baseadas na reposição de NO e inibição de eicosanoides constritores sobre a função vascular cerebral e como terapia adjuvante ao artesunato na malária cerebral experimental por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA).

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se a L-arginina, associada ao artesunato, reverte o processo isquêmico cerebral e a quebra da barreira hematoencefálica na MCE;
- Verificar se a droga híbrida ART-NO reverte o processo isquêmico cerebral e a quebra da barreira hematoencefálica na MCE;
- Verificar se o ozagrel, associado ao artesunato, reverte o processo isquêmico cerebral e a quebra da barreira hematoencefálica na MCE;
- Determinar os níveis de metabólitos vasoativos do ácido araquidônico na malária cerebral e na malária não cerebral, e o efeito do tratamento com inibidores das enzimas responsáveis pela geração de tais metabólitos na MCE;
- Verificar o efeito dessas intervenções na sobrevivência de animais com MCE;
- Investigar a vasorreatividade e a biodisponibilidade de NO em artérias cerebrais isoladas de camundongos com MCE.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos da linhagem C57BL/6 (18-20 gramas), fêmeas, com idade entre 8 e 10 semanas, produzidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB, Fiocruz) foram utilizados neste estudo. Todos os animais foram mantidos sob temperatura constante (22-24°C) com acesso livre a ração e água e com um ciclo de 12 horas claro/escuro. O estudo foi aprovado pelo Comitê de ética no uso de animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ), sob a licença L-037/2015.

3.2 Parasito e infecção dos animais

Infecção de passagem: Amostras de sangue de camundongos C57BL/6 contendo hemácias infectadas por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) expressando a proteína fluorescente verde (*green fluorescent protein*, GFP; uma doação do *Malaria Research and Reference Reagent Resource Center* – MR4, Manassas, VA; depositado por C.J. Janse e A.P. Waters; MR4 número: MRA-865) (PbA-GFP), ou infectadas por *Plasmodium berghei* NK65 (PbNK65; amostra gentilmente doada pela Dra. Dalma Maria Banic), previamente mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas e injetadas por via intraperitoneal (i.p.) em camundongos passagem. Estes animais serviram como doadores de parasitos posteriormente para a infecção dos grupos experimentais.

Infecções experimentais: Camundongos C57BL/6 (18-20 gramas), fêmeas, foram inoculados intraperitonealmente com uma suspensão de 100 µL contendo 1×10^6 hemácias parasitadas por PbA-GFP ou por PbNK65 (dia 0 de infecção). Para determinação da parasitemia, a partir do sexto dia após a infecção foi coletada uma gota de sangue (~ 3 µL) da cauda do animal infectado e depositada sobre uma lâmina para confecção de distensão sanguínea. A lâmina foi fixada com metanol, corada por Giemsa (Laborclin) e lida sob óleo de imersão em microscópio de campo claro (Eclipse 80i, Nikon) utilizando a objetiva de 100X. A parasitemia foi calculada pelo número de hemácias infectadas em pelo menos 1.000 hemácias totais. Alternativamente, a parasitemia em animais infectados por PbA-GFP foi avaliada por citometria de fluxo que identificou e quantificou as hemácias infectadas em um total de 10.000 hemácias

(10.000 eventos). As medidas de temperatura corporal foram realizadas com auxílio de um termômetro (Oakton® Acorn TM; Oakton Instruments, IL, USA) com sonda retal própria para camundongos. Animais infectados por PbA-GFP com temperaturas variando entre 31,0 e 36,0°C no sexto dia após a infecção foram considerados dentro do critério objetivo de tratamento do estudo (animais com MCE consistentemente apresentam hipotermia progressiva, assim, a temperatura retal dos camundongos serve para “estagiar” a síndrome neurológica e homogeneizar os grupos de tratamento).

3.3 Avaliação do fluxo sanguíneo cerebral

O fluxo sanguíneo cerebral foi mensurado através da técnica de *Laser Speckle* com Contraste de Imagem (*Laser Speckle Contrast Imaging* - LSCI, PeriCam PSI System, Perimed, Suécia). Resumidamente, nesta técnica a luz do *laser* incide sobre a superfície do crânio e atinge o córtex cerebral. Essa luz é, então, refletida para uma câmera acoplada à cabeça do *laser* e o produto da velocidade e concentração das células sanguíneas é lido por um mecanismo denominado padrão de contraste *speckle* (Figura 8).

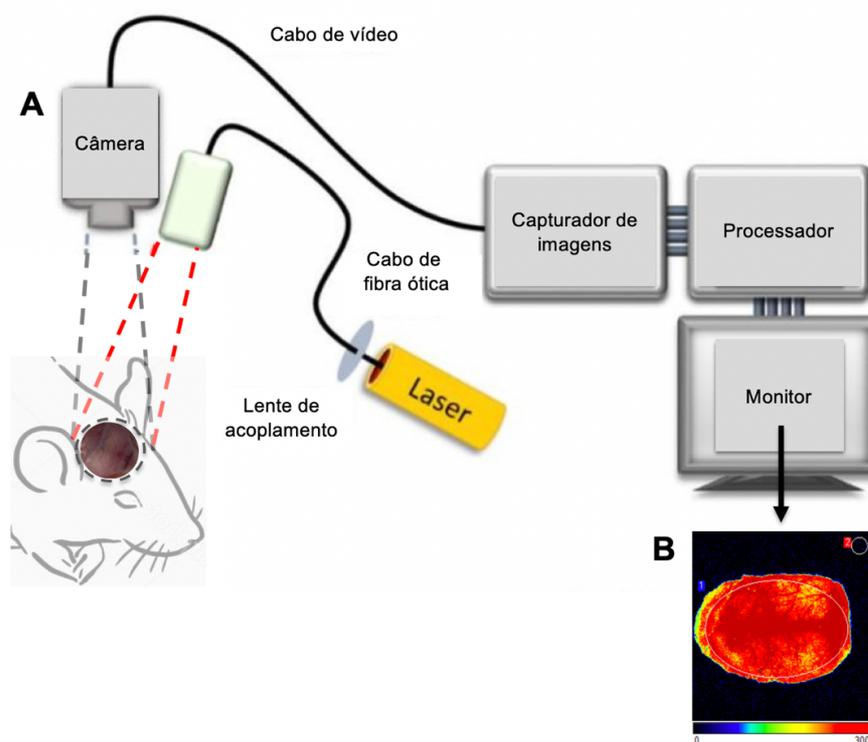


Figura 8 - Laser Speckle com Contraste de Imagem (LSCI).

A - Diagrama esquemático mostrando o arranjo típico de uma instalação LSCI. **B** - Padrão *speckle* representando o fluxo sanguíneo cerebral em tempo real. DEEGAN; WANG, 2019, p. 16, modificado pelo Dr. Leonardo J. M. Carvalho e Aline S. Moreira.

O *laser speckle* gera três imagens computadorizadas: uma imagem do animal sob o *laser*, outra em preto e branco da área delimitada para o estudo e uma terceira imagem também da área delimitada para o estudo, mas com o padrão *speckle* representando o fluxo sanguíneo em tempo real, baseado numa escala de cores que vai do preto (0 unidades de perfusão arbitrárias – UPA) ao vermelho (300 UPA). Quanto maior o contraste *speckle*, menor o fluxo sanguíneo e mais azulada aparece a imagem gerada da microcirculação cerebral pelo *laser*. Quanto menor o contraste *speckle*, maior o fluxo sanguíneo microvascular e mais avermelhada aparece a imagem. Assim, com o objetivo de investigar o comportamento do fluxo sanguíneo cerebral antes e após intervenções em animais que desenvolvem a MCE a técnica de *laser speckle* foi utilizada.

No sexto dia de infecção, animais com temperaturas variando entre 31,0 e 36°C foram selecionados para o estudo e tratados (as intervenções são descritas abaixo). Uma, três e seis horas após o tratamento, os camundongos foram anestesiados com uretano (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) 2 mg/g i.p.. O uretano foi o anestésico de escolha, pois induz anestesia profunda interferindo minimamente sobre os sistemas cardiovascular e respiratório dos animais (HARA; HARRIS, 2002). O processo cirúrgico foi iniciado assim que o reflexo podal dos animais foi cessado. Após tricotomia da cabeça e assepsia da região com Povidine®, o animal foi colocado sobre o aparelho estereotáxico em decúbito ventral, foi realizada a incisão do escalpo e remoção do periósteo permitindo, desta maneira, a exposição do crânio. Como o crânio dos camundongos é pouquíssimo espesso, não foi preciso realizar craniotomia prévia para aquisição de medidas de fluxo sanguíneo tecidual, pois o *laser* é capaz de atingir o tecido cerebral através do osso com penetração de até 1mm de profundidade a partir do ponto de luz do *laser* que atinge o tecido (AYATA et al., 2004, DUNN, 2012).

O animal com o crânio já exposto foi posicionado sob a luz do LSCI com um comprimento de onda de 785 nm para medida da perfusão sanguínea cerebral. A distância entre a cabeça do laser e o crânio do animal foi de 10 cm, como recomendada pelo fabricante. A temperatura corporal dos animais foi mantida em 36°C com auxílio de uma manta aquecedora (Harvard Apparatus).

Antes de iniciar a aquisição das medidas de fluxo sanguíneo, a superfície exposta do crânio foi umedecida com salina e coberta com uma fina camada de óleo mineral para evitar a secagem ao longo do experimento. Em seguida, uma área de aproximadamente 2 cm² na superfície do crânio foi delimitada, e a região de interesse (*region of interest*, ROI), onde se pretendia avaliar o fluxo sanguíneo microvascular

cerebral, foi definida. A mesma ROI foi utilizada para todos os animais que participaram desse experimento.

Para as avaliações de curto prazo (1 hora), as medidas de fluxo sanguíneo cerebral foram realizadas no mesmo animal antes (basal) e após a intervenção (tratamento) continuamente durante 60 minutos. Nas avaliações de longo prazo (3 e 6 horas), diferentes grupos de animais foram utilizados para cada *timepoint*.

Análise de 6 imagens/segundo e o fluxo sanguíneo cerebral relativo de todos os animais foram adquiridos utilizando o software Perisoft (PeriCam PSI System, Perimed, Suécia) e expressos em unidades de perfusão arbitrárias (UPA). Ao término do experimento os animais foram submetidos à eutanásia com *overdose* de uma mistura dos anestésicos cetamina 300mg/kg (Syntec, São Paulo, Brasil) e xylazina 30mg/kg (Syntec, São Paulo, Brasil) via i.p. seguida de deslocamento cervical.

Os tratamentos realizados nesses experimentos, doses das drogas, vias de administração e volumes finais injetados por animal foram os seguintes:

- Artesunato (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio (Reatec) a 5% i.p. (200 µL);
- L-arginina (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) 50mg/kg em salina administrada por via subcutânea (s.c.; 200 µL);
- Salina s.c. (200 µL).

3.4 Ensaios de sobrevida

Ensaios de sobrevida foram realizados com o objetivo de verificar se a L-arginina ou o ozagrel teriam um efeito benéfico quando administrados como terapia adjuvante em combinação com artesunato em camundongos que desenvolvem a MCE. Além disso, o efeito do tratamento com ART-NONO (uma droga híbrida com efeito antiplasmodial e repositora de NO) sobre a sobrevida de animais com MCE também foi avaliado. Dessa forma, no sexto dia após a infecção, camundongos com temperaturas variando entre 31,0 e 36,0°C foram selecionados para o ensaio e divididos aleatoriamente nos seguintes grupos:

- 1- Tratados com artesunato 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio a 5% i.p. (200 µL) mais salina s.c. (200 µL);
- 2- Tratados com artesunato 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio a 5% i.p. (200 µL) mais L-arginina 50mg/kg em salina s.c. (200 µL);

3- Tratados com artesunato 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio a 5% i.p. (200 µL) mais ozagrel (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) 100mg/kg em salina s.c. (200 µL);

4- Tratados com artesunato 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio a 5% i.p. (200 µL);

5- Tratados com ART-NONO 44mg/kg em água deionizada i.p. (200 µL).

Para os experimentos com ozagrel e L-arginina, todos os animais receberam artesunato duas vezes ao dia (manhã e final da tarde) durante 5 dias a partir do sexto dia após a infecção. L-arginina ou salina foram administradas uma vez ao dia (manhã) nos dois primeiros dias de tratamento (grupo experimental L-arginina). Uma única dose de ozagrel ou salina foi administrada (manhã) no primeiro dia de tratamento (grupo experimental ozagrel). Para os experimentos com ART-NONO, os animais receberam artesunato ou a droga híbrida (ART-NONO) no sexto dia após a infecção (uma dose de cada droga pela manhã) e somente o artesunato foi administrado em dose única diária nos 4 dias seguintes (totalizando 5 dias de tratamento). Os animais foram acompanhados por mais 7 dias após o último dia de tratamento com artesunato. Os camundongos foram monitorados diariamente, duas vezes ao dia a partir do primeiro dia de tratamento até o término do experimento para análise da mortalidade dos grupos. A parasitemia e temperatura dos animais foram checadas uma vez ao dia durante os cinco dias de tratamento e no último dia do experimento (onze dias após o primeiro dia de tratamento).

Animais infectados por PbA-GFP que não preenchiam o critério objetivo de tratamento, como animais com temperaturas abaixo de 31,0°C ou acima de 36,0°C, animais que não se recuperaram após tratamento e evoluíram com o agravamento do quadro (temperatura abaixo de 30°C, coma, convulsões ou dificuldade de respirar) foram submetidos à eutanásia com *overdose* de uma mistura dos anestésicos cetamina 300mg/kg e xylazina 30mg/kg via i.p. seguida de deslocamento cervical.

3.5 Análise de permeabilidade da barreira hematoencefálica

Para avaliar a integridade da barreira hematoencefálica realizamos a perfusão dos animais com azul de Evans. O azul de Evans é um corante que tem alta afinidade pela albumina sérica. Quando injetado por via intravenosa, liga-se totalmente à albumina, formando um complexo de alto peso molecular que não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica em condições fisiológicas. Se houver

rompimento da barreira, o complexo azul de Evans-Albumina extravasa da circulação para o tecido cerebral e o corante acumulado pode ser quantificado após extração a partir do cérebro (YAO et al., 2018).

No sexto dia após a infecção, animais com temperaturas entre 31,0 e 36,0°C foram selecionados e distribuídos aleatoriamente nos seguintes grupos:

1- Tratados com artesunato 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio a 5% i.p. (100 µL) mais salina s.c. (100 µL);

2- Tratados com artesunato 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio a 5% i.p. (100 µL) mais L-arginina 50mg/kg em salina s.c. (100 µL);

3- Tratados com artesunato 32mg/kg em solução de bicarbonato de sódio a 5% i.p. (100 µL) mais ozagrel 100mg/kg em salina s.c. (100 µL).

Cinco horas após o tratamento, os animais foram anestesiados com uretano 2 mg/g i.p. e receberam por via intravenosa através do plexo orbital 150 µL de uma solução do corante azul de Evans (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 2% em tampão fosfato-salino (*Phosphate Buffered Saline*, PBS) 1X. Após uma hora da circulação do corante, o animal foi perfundido transcárdialmente com salina gelada (10mL) através do ventrículo esquerdo. Os animais foram eutanasiados por decapitação, tiveram o cérebro coletado, pesado, armazenado em tubo Falcon contendo 3mL de formamida (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) e, então, incubado por 48h a 37°C. Transcorrido o tempo de incubação, 100 µL de cada amostra foram coletados e depositados em placas de ELISA de 96 poços. A curva padrão foi construída a partir de diluições seriadas da solução estoque do corante. Solução de formamida foi utilizada como branco para o teste. A quantificação do corante azul de Evans na solução de formamida foi realizada por espectrofotômetro (BioTek Elx800) em 620nm.

3.6 Medida dos níveis de eicosanoides e GMP cíclico no cérebro por ensaio imunoenzimático (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – ELISA)

O ensaio imunoenzimático foi utilizado para determinar as concentrações basais dos eicosanoides no cérebro de animais controles (não infectados), de animais que desenvolveram MCE (infectados por PbA-GFP) e naqueles que não desenvolveram MCE (MNC - Malária não cerebral; infectados por PbNK65). Além disso, no grupo de animais que desenvolveu MCE, foram determinadas as concentrações dos eicosanoides após intervenção com drogas inibidoras da produção

dos mesmos. As concentrações de GMP cíclico no tecido cerebral de animais com MCE antes e após tratamento com L-arginina também foram determinadas.

3.6.1 Coleta e preparo das amostras para quantificação dos eicosanoides

Animais infectados por PbA-GFP que desenvolveram MCE e animais infectados por PbNK65 foram submetidos à eutanásia com *overdose* de uma mistura dos anestésicos cetamina 300mg/kg e xylazina 30mg/kg via i.p. seguida de deslocamento cervical e tiveram os cérebros coletados no sexto dia após a infecção. Cérebros de animais com MCE que receberam alguma das intervenções listadas abaixo foram coletados 1 hora após o tratamento.

1- HET0016 (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) 10mg/kg em etanol + polietilenoglicol + salina (2:2:6 [vol/vol]) s.c. (200 µL);

2- HET0016 (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) 10mg/kg em solução de dimetilsulfóxido (*Dimethyl Sulfoxide*, DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 5% s.c. (200 µL);

3- AUDA (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) 2mg/kg em etanol + polietilenoglicol + salina (2:2:6 [vol/vol]) s.c. (200 µL);

4- AUDA (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) 2mg/kg em solução de DMSO a 5% s.c. (200 µL);

5- Ozagrel (Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA) 100mg/kg em salina s.c. (200 µL);

6- Salina s.c. (200 µL);

7- Etanol + polietilenoglicol + salina (2:2:6 [vol/vol]) s.c. (200 µL);

8- Solução de DMSO a 5% s.c. (200 µL).

Cérebros de animais controles (não infectados) também foram coletados.

Após coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a -70°C até serem processadas. Para determinação das concentrações de eicosanoides, o cérebro foi descongelado, pesado e, então, homogeneizado no gelo com 1mL do tampão de homogeneização [0.1M de fosfato de sódio (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), pH 7.4, contendo 1mM de ácido etilendiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*, EDTA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), e 10 µM de indometacina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)], utilizando um macerador de tecidos (CORNING). As amostras foram centrifugadas a 20.000 g durante 30 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante (aproximadamente 700 µL) foi coletado e misturado com o mesmo volume de uma

mistura (1:1) de acetona (Vetec) e acetato de etila (Vetec) e, então, vortexado por 45 segundos. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 g durante 15 minutos a 4°C. A fase orgânica resultante foi coletada, seca utilizando o *speed vacuum* (modelo iss110, Savant) durante 3 horas e, em seguida, congelada a -70°C.

3.6.2 Coleta e preparo das amostras para quantificação de GMP cíclico (GMPc)

Animais infectados por PbA-GFP que desenvolveram MCE no sexto dia de infecção receberam uma das intervenções descritas abaixo e uma hora após o tratamento, foram submetidos à eutanásia com overdose de uma mistura dos anestésicos cetamina 300mg/kg e xylazina 30mg/kg via i.p. seguida de deslocamento cervical. O cérebro dos animais foi coletado para quantificação de GMPc.

1- Salina s.c. (200 µL);

2- L-arginina 50mg/kg em salina s.c. (200 µL).

Cérebros de animais controles (não infectados) também foram coletados.

Após coleta, as amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e, em seguida, armazenadas a -70°C até serem processadas. Para determinação das concentrações de GMPc, o cérebro foi descongelado, pesado e, então, homogeneizado no gelo com 2,5 mL de uma solução de ácido tricloroacético (*Trichloroacetic acid*, TCA; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) a 5% utilizando um macerador de tecidos (CORNING). As amostras foram centrifugadas a 1.500 g durante 10 minutos a 4°C. O sobrenadante resultante foi coletado e misturado a uma solução saturada de éter (1:5 [v/v]). Homogeneizou-se a solução durante 10 segundos. Após isso, a fase orgânica (éter) foi coletada, descartada e a extração foi repetida mais uma vez. Em seguida, as amostras foram submetidas a aquecimento em banho Maria durante 5 minutos a 70°C para eliminação do éter residual que, porventura, pudesse ainda estar presente nas amostras. Finalmente, as amostras foram congeladas a -70°C até que pudessem ser utilizadas no ELISA.

3.6.3 Determinação das concentrações de eicosanoides e GMPc no cérebro por ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay – ELISA)

No dia da realização do ELISA para quantificação dos eicosanoides, as amostras secas foram descongeladas e ressuspensas em 500µL do tampão do ensaio imunoenzimático. As concentrações de 20-HETE e 14,15-DHET no tecido cerebral foram determinadas utilizando kits de ELISA adquiridos da Detroit R&D. Concentrações de TXB₂, 8-isoprostanos e PGE₂ foram determinadas através de kits

de ELISA adquiridos da Cayman Chemical. Kit de ELISA adquirido da MyBioSource foi utilizado para determinar os níveis do metabólito 14,15-EET. As concentrações de GMPc foram determinadas a partir de amostras descongeladas no dia da realização do ELISA utilizando kit adquirido da Cayman Chemical. Todos os ensaios foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes. A concentração dos eicosanoides foi determinada por leitura em espectrofotômetro (BioTek Elx800) no comprimento de onda de 450nm para os ensaios da Detroit R&D e MyBioSource. Ensaios da Cayman Chemical foram lidos em 405nm. A concentração de GMPc, em particular, foi determinada por leitura em espectrofotômetro (Spectramax 190) no comprimento de onda de 420nm.

3.7 Avaliação *ex vivo* da reatividade vascular

Para avaliar a vasorreatividade em artérias cerebrais isoladas de animais controles (não infectados) e animais infectados por PbA que desenvolveram MCE, um sistema de miografia pressurizado de vasos isolados (Danish Myo Technologies) foi utilizado.

3.7.1 Coleta da artéria cerebral média (*middle cerebral artery* – MCA)

No sexto dia após a infecção, camundongos infectados por PbA-GFP que desenvolveram MCE foram anestesiados com isoflurano (4% para indução e 3% para manutenção), eutanasiados e, então, imediatamente decapitados. Para posterior isolamento da artéria cerebral média (MCA), o cérebro dos animais foi removido da caixa craniana e depositado em placa de Petri de vidro contendo tampão Krebs-HEPES (tampão KH) a 4°C. Cada MCA foi dissecada a partir da sua origem no círculo de Willis se estendendo por todo o comprimento do vaso e, então, depositada em uma câmara de microvaso (capacidade máxima de 2 mL) preenchida com tampão KH aquecido a 37°C. A MCA foi canulada em cada extremidade com micropipetas de vidro (diâmetro de 40 µm) e amarrada com 2 fios de sutura nylon monofilamento (10-0) em cada uma das suas extremidades (a extremidade proximal do vaso canulada na pipeta de influxo e a extremidade terminal do vaso canulada na pipeta de efluxo. As micropipetas foram ajustadas até que a MCA estivesse minimamente distorcida e próxima do seu comprimento *in vivo*; Figura 9 A) dentro de uma câmara de microvaso aquecida (37°C) que permitiu que o lúmen e o exterior do vaso fossem perfundidos e superfundidos, respectivamente, com tampão KH a partir de reservatórios separados. O tampão KH foi equilibrado com uma mistura de gases (21% de O₂, 5% de CO₂ e

74% de N₂) e tinha a seguinte composição (mM): NaCl, 130; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄-7H₂O, 1.17; NaHCO₃, 14.9; Dextrose, 5.5; CaNa₂ Versenate (EDTA), 0.026; CaCl₂, 1.6 e HEPES, 10. O pH do tampão foi ajustado para 7.4. Os diâmetros interno e externo da MCA foram medidos utilizando videomicroscopia (aumento de 10X) via micrômetro de vídeo na tela (Figura 9 B). As MCAs de animais não infectados foram coletadas da mesma maneira que as MCAs de animais com MCE servindo, dessa forma, como controles do experimento.

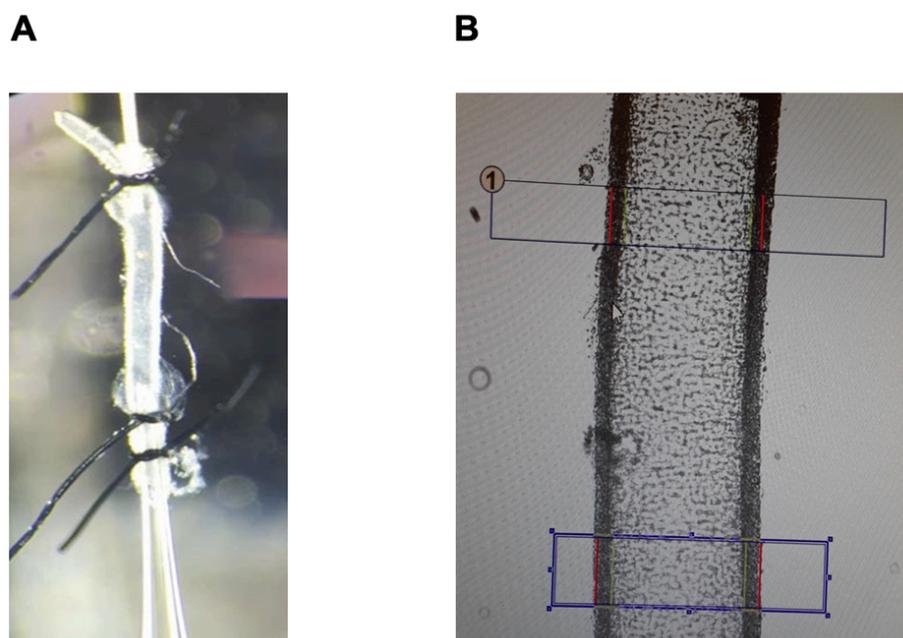


Figura 9 - Imagem representativa de uma microvaso canulado.

A - Artéria cerebral média canulada em cada extremidade com micropipetas de vidro e amarrada com dois fios de sutura em cada uma das suas extremidades. **B** - Imagem ampliada mostrando a determinação dos diâmetros interno e externo da MCA medido por micrômetro de vídeo na tela. Imagens fornecidas pelo Dr. Steven Brooks (LMVR-NIAID/NIH).

3.7.2 Medida da reatividade vascular em MCA isolada

Após a canulação, a MCA foi equilibrada a 80% da pressão arterial média do camundongo para se aproximar da pressão de perfusão *in vivo* (aproximadamente 80mmHg). A reatividade das artérias isoladas foi avaliada em resposta a concentrações crescentes (com exceção de L-NAME, avaliada apenas na maior concentração) sequenciais das seguintes drogas:

- Metacolina (*Methacholine* - MCh; induz a produção de NO através da ativação da eNOS), para avaliar vasodilatação dependente do endotélio: 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M;
- Nitroprussiato de sódio (*Sodium nitroprusside* - SNP; doador de NO), para avaliar vasodilatação independente do endotélio: 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M;
- Serotonina (*Serotonin/5-hydroxytryptamine* - 5-HT; potente vasoconstritor cerebral), para avaliar a resposta constritora vascular: 10⁻⁹ a 10⁻⁴ M;

- N^w-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME; inibidor da síntese de NO pela NOS), para inibir a enzima NOS: 10⁻⁴.

O diâmetro interno e externo de repouso para cada MCA foi medido antes da incubação com a droga. A mudança no diâmetro interno e externo da MCA foi avaliada de 30 segundos a 2 minutos após a administração de cada droga ao superfusato. A câmara de microvaso foi lavada três vezes e o tampão KH foi sempre substituído antes de avaliar a reatividade vascular a uma nova droga. A mudança no diâmetro foi medida em micrômetros e depois normalizada como variação percentual a partir do diâmetro basal do vaso.

3.8 Avaliação *ex vivo* da produção de NO

Para avaliar a produção de NO pelas artérias cerebrais isoladas de animais controles (não infectados) e animais que desenvolveram MCE, o ensaio com 4,5-diaminofluoresceína (4,5 diaminofluorescein, DAF-2; Cayman Chemical, Ann Harbor, MI, USA), um detector fluorescente de NO, foi utilizado.

3.8.1 Coleta das artérias cerebrais

No sexto dia após a infecção, camundongos infectados por PbA-GFP que desenvolveram MCE foram anestesiados com isoflurano (4% para indução e 3% para manutenção), eutanasiados e, então, imediatamente decapitados. Para posterior isolamento das artérias cerebrais médias (MCAs), artérias cerebrais posteriores (*posterior cerebral arteries* – PCAs) e artérias cerebrais anteriores (*anterior cerebral arteries* – ACAs), o cérebro dos animais foi removido da caixa craniana e depositado em tubos Falcon contendo 40mL de tampão Krebs-HEPES (tampão KH) a 4°C. Em seguida, as MCAs, PCAs e ACAs foram dissecadas a partir de suas origens no círculo de Willis se estendendo por todo o comprimento dos vasos. Os vasos foram medidos sob um microscópio de dissecação e seccionados em segmentos de 1mm com auxílio de tesoura Vannas com lâmina de 2.5mm para uma maior exposição do endotélio vascular. Em seguida, as artérias foram depositadas em tubo eppendorf contendo 1,5mL do tampão KH e incubadas em termobloco a 37°C durante 30 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para coleta das MCAs, PCAs e ACAs de animais controles (não infectados). O tampão KH tinha a seguinte composição (mM): NaCl, 130; KCl, 4.7; KH₂PO₄, 1.18; MgSO₄-7H₂O, 1.17; NaHCO₃, 14.9; Dextrose, 5.5;

CaNa₂ Versenate (EDTA), 0.026; CaCl₂, 1.6 e HEPES, 10. O pH do tampão foi ajustado para 7.4.

3.8.2 Produção de NO por artérias cerebrais incubadas em tampão KH

No momento da realização do ensaio DAF-2, o tampão KH no qual as artérias cerebrais foram previamente incubadas foi descartado. Em seguida, MCAs, PCAs e ACAs oriundas de animais controles ou de animais com MCE foram incubadas a 37°C durante 10 minutos, de forma sequencial, nas soluções abaixo:

- 1- Tampão KH + DAF-2 [5µM] (para verificar produção basal de NO);
- 2- Tampão KH + DAF-2 [5µM] + MCh [10⁻⁵M] (para verificar produção estimulada de NO);
- 3- Tampão KH + DAF-2 [5µM] + L-NAME [10⁻⁴M] (para verificar produção basal de NO na presença de inibidor de NOS);
- 4- Tampão KH + DAF-2 [5µM] + MCh [10⁻⁵M] + L-NAME [10⁻⁴M] (para verificar produção estimulada de NO na presença de inibidor de NOS).

Transcorrido o tempo da incubação com a solução 1, esta foi coletada (200 µL) e depositada em poços previamente identificados de uma placa de poliestireno preta (Fluotrac™ 200, Greiner Bio-One) mantida em banho de gelo. As artérias cerebrais foram então incubadas com a solução 2 também a 37°C durante 10 minutos e, em seguida, a solução 2 foi coletada (200 µL) e colocada em outros poços da placa. O mesmo procedimento se repetiu até que todos os *pools* (MCAs, PCAs e ACAs) de artérias cerebrais (cada *pool* oriundo de um único animal) de animais controles ou de animais com MCE fossem incubados em todas as quatro soluções acima e essas soluções fossem em seguida depositadas na placa (sempre em volume de 200 µL). O sinal de fluorescência em cada poço da placa foi lido por um leitor de placas (VICTOR® Nivo™, Perkin Elmer) com excitação a 485 nm e detecção a 538 nm. As concentrações de NO foram calculadas como variação percentual a partir do *baseline*.

3.8.3 Produção de NO por artérias cerebrais incubadas em plasma

Para obtenção de plasma, camundongos infectados por PbA-GFP que desenvolveram MCE no sexto dia após a infecção ou animais controles (não infectados) foram anestesiados com isoflurano (4% para indução e 3% para manutenção). Após anestesia, o sangue do animal foi obtido por punção cardíaca através do ventrículo esquerdo em EDTA e depositado em tubo eppendorf. As

amostras foram imediatamente centrifugadas a 4°C (200 g durante 15 min) para a coleta do plasma.

No momento da realização do ensaio DAF-2, o tampão KH no qual as artérias cerebrais foram previamente incubadas foi descartado. Em seguida, MCAs, PCAs e ACAs oriundas de animais controles ou de animais com MCE foram incubadas a 37°C durante 10 minutos nas soluções abaixo de maneira sequencial:

- 1- Plasma controle + DAF-2 [5µM];
- 2- Plasma MCE + DAF-2 [5µM];
- 3- Plasma controle + DAF-2 [5µM] + MCh [10⁻⁴M].

Transcorrido o tempo da incubação com a solução 1, esta foi coletada (200 µL) e depositada em poços previamente identificados de uma placa de poliestireno preta (Fluotrac™ 200, Greiner Bio-One) mantida em banho de gelo. As artérias cerebrais foram então incubadas com a solução 2 também a 37°C durante 10 minutos e, em seguida, a solução 2 foi coletada (200 µL) e colocada em outros poços da placa. O mesmo procedimento se repetiu até que todos os *pools* (MCAs, PCAs e ACAs) de artérias cerebrais (cada *pool* oriundo de um único animal) de animais controles ou de animais com MCE fossem incubados em todas as soluções acima e essas soluções fossem em seguida depositadas na placa (sempre em volume de 200 µL). O sinal de fluorescência em cada poço da placa foi lido por um leitor de placas (VICTOR® Nivo™, Perkin Elmer) com excitação a 485 nm e detecção a 538 nm. As concentrações de NO foram calculadas como variação percentual a partir do *baseline*.

3.9 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o *software* estatístico Prism 8.0 (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Para análises de parasitemia, temperatura corporal e medidas de fluxo sanguíneo cerebral basal foi utilizado o teste *t-Student* não pareado. Avaliação da progressão temporal das temperaturas e parasitemias entre diferentes grupos tratados foi realizada pelo teste *Two-way* ANOVA. Teste *Two-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para análise de fluxo sanguíneo cerebral antes e após as intervenções. A curva de sobrevivência foi analisada pelo teste Log-Rank (Mantel-Cox). *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para análise dos dados do corante azul de Evans e do ELISA. Os dados gerados pelo ensaio DAF-2 foram

analisados por teste *Two-way* ANOVA. A reatividade vascular da MCA foi analisada por teste *Two-way* ANOVA para determinar o efeito de diferentes concentrações de MCh, 5-HT ou SNP em animais controles e animais com MCE. Análise da reatividade vascular após estímulo com MCh, 5-HT ou SNP na presença de L-NAME foi realizada por teste *t-Student*. Valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil da infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA)

Durante o desenvolvimento deste estudo, foi utilizado um total de 1.095 camundongos C57BL/6, entre animais controles não infectados, infectados com PbA e infectados com PbNK65. É importante enfatizar que entre os animais infectados com PbA (796 animais) nem todos foram efetivamente utilizados nos experimentos, isso porque no sexto dia após a infecção, quando a maioria dos camundongos desenvolve a MCE, no momento em que foram checados, alguns (118 animais) já estavam em estágio mais avançado da síndrome neurológica (temperaturas abaixo de 31°C, fora da faixa ideal estabelecida como critério para tratamento - entre 31 e 36°C), tendo que ser, assim, submetidos a eutanásia.

4.2 Animais com MCE apresentam queda acentuada de fluxo sanguíneo cerebral

Animais que desenvolveram MCE no sexto dia após infecção apresentaram queda significativa no fluxo sanguíneo cerebral basal quando comparados a animais controles não infectados (Figura 10 A). Nas imagens geradas pelo LSCI é possível observar de maneira bastante clara a acentuada diminuição no fluxo sanguíneo cerebral dos animais com MCE (Figura 10 D e E) em relação aos controles (Figura 10 B e C).

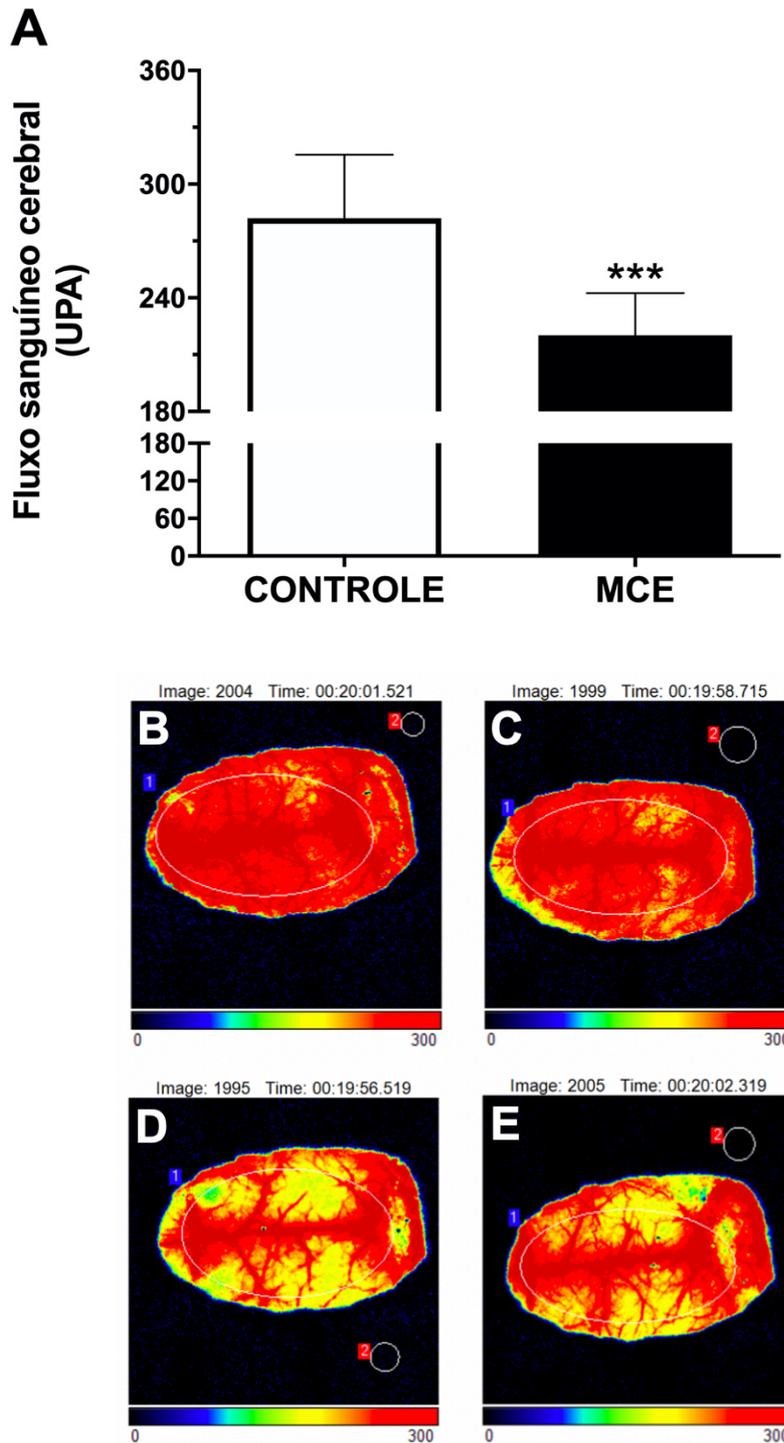


Figura 10 - Fluxo sanguíneo cerebral basal de animais controles não infectados e animais com MCE.

A - Fluxo sanguíneo cerebral de animais controles (n=8) e animais com MCE (n=9). Teste t não pareado bicaudal foi utilizado para a análise estatística dos dados. O fluxo sanguíneo cerebral basal foi significativamente menor em animais que desenvolveram MCE quando comparados ao grupo controle não infectado (P=0.0004). **B e C** - Imagens representativas do fluxo sanguíneo cerebral basal de dois camundongos do grupo controle não infectado. **D e E** - Imagens representativas do fluxo sanguíneo cerebral basal de animais com MCE. UPA, unidades de perfusão arbitrárias; MCE, Malária cerebral experimental.

4.3 Efeito da terapia adjuvante com L-arginina sobre a MCE

4.3.1 L-arginina induz aumento transiente de fluxo sanguíneo cerebral em associação com artesunato

Nós havíamos demonstrado anteriormente que L-arginina, por si só, era capaz de induzir um aumento de fluxo sanguíneo cerebral em animais com MCE uma hora após a administração (Moreira AS, dissertação de mestrado). Nós perguntamos então se, no contexto do tratamento com antimalárico (artesunato), esse benefício também ocorreria e se poderia ser prolongado.

Assim, no sexto dia após a infecção, animais que desenvolveram MCE foram selecionados para o experimento e tratados aleatoriamente com artesunato mais salina ou L-arginina. Após 1, 3 e 6 horas do tratamento, os animais foram anestesiados e submetidos a medidas de fluxo sanguíneo cerebral durante 20 minutos pelo LSCI. Como pode ser observado na figura 11, animais com MCE tratados com artesunato mais L-arginina apresentaram um aumento no fluxo sanguíneo cerebral uma hora após a intervenção quando comparados aos animais com MCE antes do tratamento. Além disso, o fluxo sanguíneo cerebral do grupo tratado com artesunato combinado com L-arginina foi significativamente maior do que o fluxo do grupo que recebeu artesunato mais salina, e não foi diferente do fluxo de animais controles não infectados. No entanto, a melhora do fluxo sanguíneo após o tratamento com L-arginina foi transiente, visto que o fluxo sanguíneo cerebral retornou aos níveis pré-tratamento 3 e 6 horas após a intervenção e não foram diferentes dos animais que receberam artesunato mais salina.

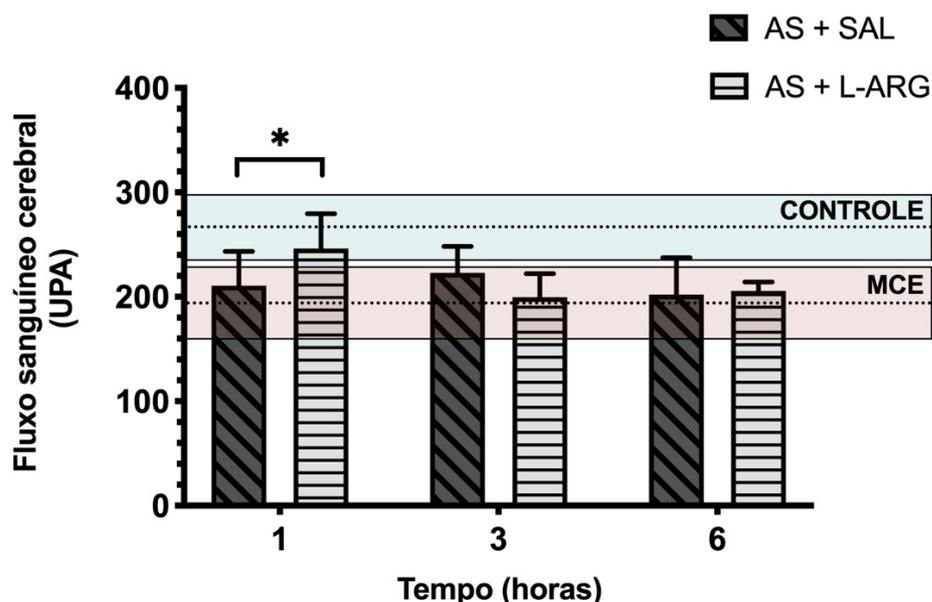


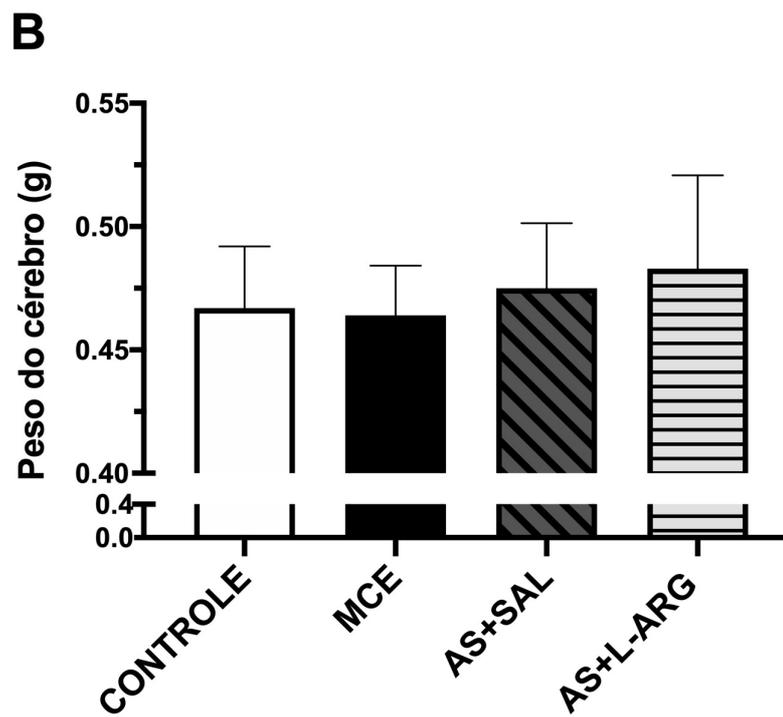
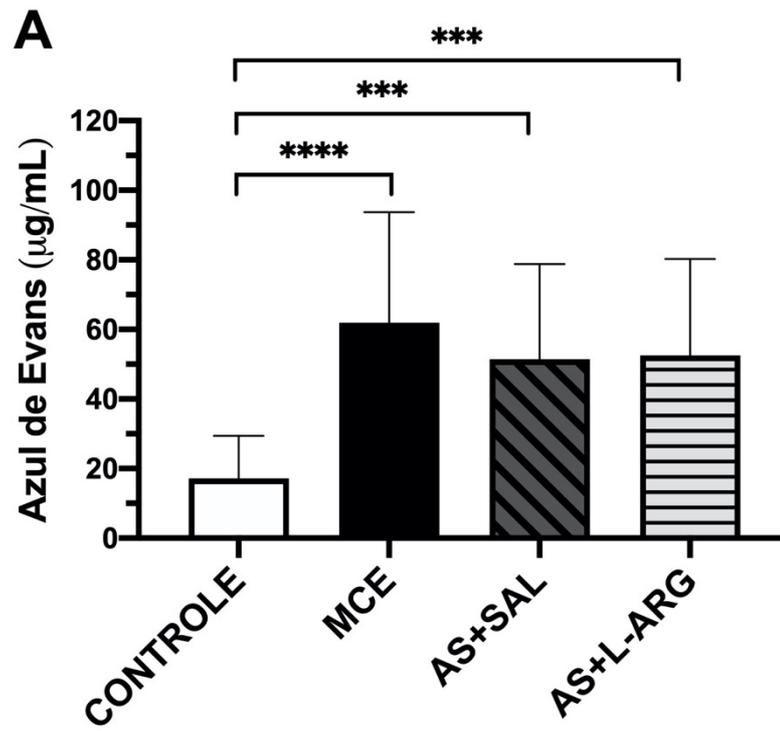
Figura 11 - Fluxo sanguíneo cerebral em camundongos com MCE tratados com artesunato mais salina ou L-arginina.

As medidas de fluxo sanguíneo cerebral foram realizadas em grupos independentes de animais 1, 3 e 6 horas após o tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina, e são mostrados como barras nas figuras (n= 4 a 8 animais por grupo). A média \pm desvio padrão do fluxo sanguíneo cerebral de camundongos controles não infectados e camundongos com MCE não tratados são mostrados como linhas pontilhadas (média) e caixas horizontais coloridas (desvio padrão; verde claro para controles não infectados e vermelho claro para camundongos com MCE não tratados), para permitir a comparação ao longo dos *timepoints*. Comparações foram feitas entre os grupos tratados (artesunato mais salina x artesunato mais L-arginina) em cada *timepoint*. Teste *Two-way ANOVA* e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Animais tratados com artesunato mais L-arginina apresentaram fluxo sanguíneo cerebral maior do que animais tratados com artesunato mais salina 1 hora após a intervenção (P=0.0262). Não houve diferença entre os grupos nos *timepoints* 3 e 6 horas. UPA, unidades de perfusão arbitrárias; MCE, malária cerebral experimental; AS, artesunato; SAL, salina; L-ARG, L-arginina.

4.3.2 Terapia adjuvante com L-arginina não afeta a permeabilidade da barreira hematoencefálica em animais com MCE

Animais que desenvolveram MCE no sexto dia após a infecção foram selecionados para o estudo e aleatoriamente tratados com artesunato combinado com salina ou L-arginina (50mg/kg). Cinco horas após o tratamento, os animais receberam o corante azul de Evans por via intravenosa. Após uma hora de circulação do corante, os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram o cérebro coletado. Animais que desenvolveram MCE apresentaram aumento significativo no extravasamento do corante azul de Evans para o tecido cerebral quando comparados ao grupo controle não infectado, indicando quebra da barreira hematoencefálica. O tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina não teve qualquer efeito sobre a intensidade de extravasamento do corante (Figura 12 A) 6 horas após o tratamento. Não foram observadas diferenças significativas no peso do cérebro dos animais com MCE antes ou após os tratamentos quando comparados ao grupo controle não infectado (Figura

12 B). A parasitemia dos animais diminuiu seis horas após o tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina (Figura 12 C). No entanto, não houve diferença nas parasitemias quando comparamos os diferentes grupos tratados.



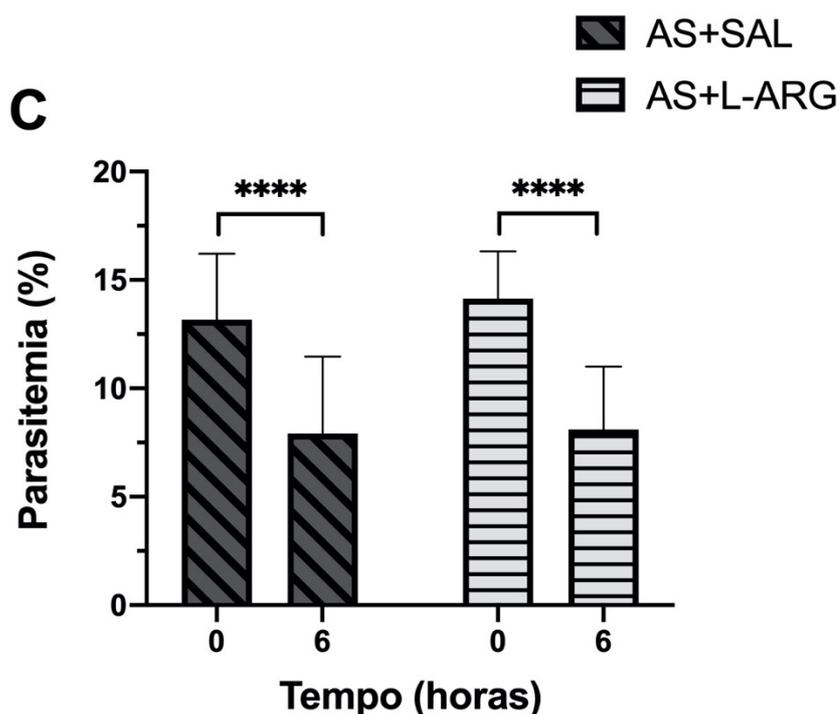


Figura 12 - Permeabilidade da barreira hematoencefálica, peso do cérebro e parasitemia antes e após tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina.

A- Concentração do corante azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral de animais com MCE antes e após tratamento. Teste *One-way* ANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Permeabilidade vascular aumentada (maior concentração do corante azul de Evans no tecido cerebral) foi observada em animais com MCE não tratados (n=14; $P < 0.0001$), tratados com artesunato mais salina (n=15; $P = 0.0002$) ou L-arginina (n=10; $P = 0.0007$) quando comparados ao grupo controle não infectado (n=15). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos infectados tratados ou não. **B** - Peso do cérebro de animais controles não infectados e animais com MCE antes e após o tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina. Teste *One-way* ANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Não houve diferença significativa no peso do cérebro entre os grupos. **C** - Efeito do tratamento com artesunato sobre a parasitemia de animais com MCE tratados com artesunato mais salina ou L-arginina. Teste *Two-way* ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados. O tratamento com artesunato reduziu em aproximadamente 40% a parasitemia dos animais nos dois grupos após 6 horas do tratamento ($P < 0.0001$). Um total de 4 experimentos foi realizado para obtenção dos resultados. MCE, malária cerebral experimental; AS, artesunato; SAL, salina; L-ARG, L-arginina.

4.3.3 Determinação dos níveis de GMPc no tecido cerebral

No sexto dia de infecção, animais que desenvolveram MCE foram tratados com salina ou L-arginina, tiveram os cérebros coletados (1 hora após o tratamento), processados e os níveis de GMPc foram determinados por ELISA. As concentrações de GMPc no tecido cerebral não foram diferentes quando comparamos o grupo controle não infectado e os grupos de animais com MCE tratados com salina ou com L-arginina (Figura 13).

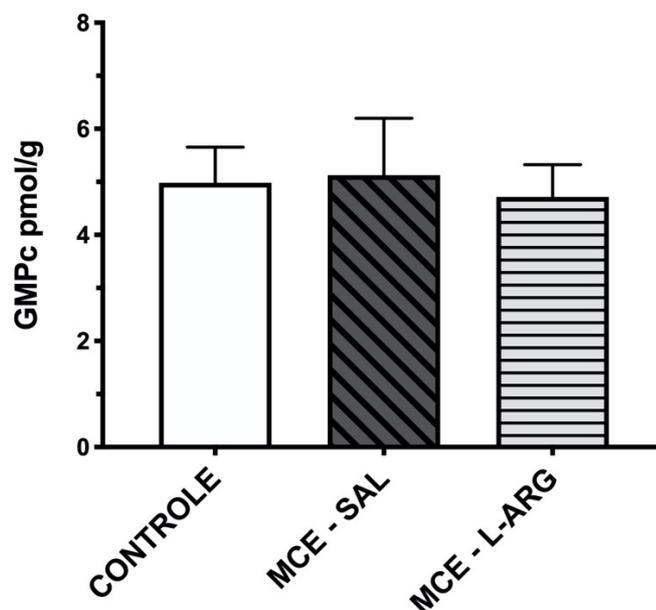


Figura 13 - Níveis de GMPc no tecido cerebral de animais com MCE após tratamento com L-arginina.

Níveis de GMPc foram determinados no cérebro de animais com MCE tratados com salina ou L-arginina. Teste *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Não houve diferença nos níveis de GMPc ($P=0.4583$) quando comparados animais controles ($n=12$), animais com MCE tratados com salina ($n= 12$) ou L-arginina ($n= 12$).

4.3.4 Terapia adjuvante com L-arginina aumenta a sobrevida de animais com MCE

Animais que desenvolveram MCE foram selecionados para o estudo e tratados aleatoriamente com artesunato (32mg/kg) combinado com salina ou combinado com L-arginina (50mg/kg em salina). Na figura 14 é possível observar que o grupo que recebeu artesunato mais L-arginina apresentou uma sobrevida significativamente maior (70%) do que o grupo tratado com artesunato mais salina (49%). As temperaturas e parasitemias dos animais no primeiro dia de tratamento não foram diferentes entre os grupos (Figura 15 A e B), confirmando que os grupos eram clinicamente homogêneos, e os animais estavam em estágios semelhantes de acometimento neurológico. A figura 16 mostra a porcentagem de parasitemia (Figura 16 A) e a temperatura (Figura 16 B) dos animais ao longo do tempo de tratamento. Podemos verificar que a parasitemia dos camundongos foi reduzida aproximadamente à metade em até 48 horas do início do tratamento e continuou diminuindo durante o tempo do experimento, enquanto a temperatura aumentou no mesmo período. Apesar das diferenças significativas nas parasitemias e temperaturas ao longo do tempo, não houve diferença nesses parâmetros quando comparamos os grupos tratados (Figura 16).

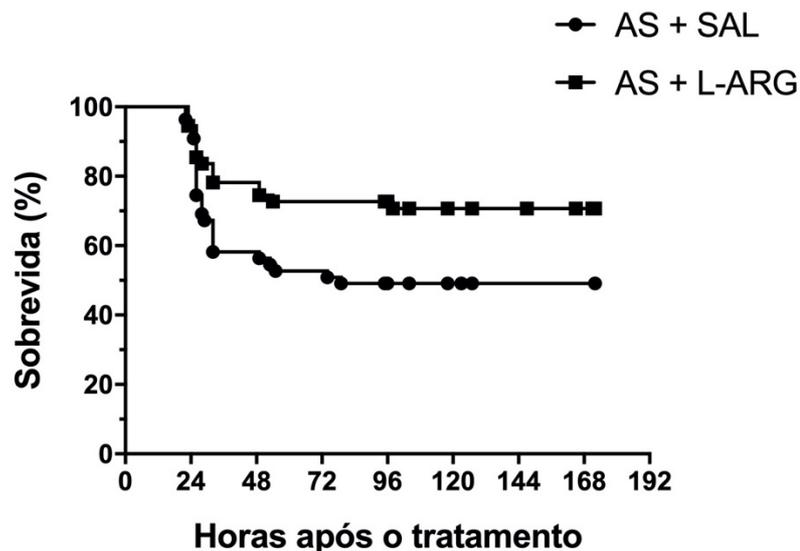


Figura 14 - Sobrevivência cumulativa de animais com MCE submetidos a tratamento com artesunato mais salina ou L-arginina.

Animais que desenvolveram MCE foram tratados com artesunato mais salina (n=55) ou artesunato mais L-arginina (n=55). Foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox) para a análise estatística dos dados. O grupo que recebeu artesunato mais L-arginina apresentou uma sobrevivência significativamente maior quando comparado ao grupo que recebeu artesunato mais salina (P=0.0191). A melhor performance do grupo tratado com artesunato mais L-arginina foi consistente nos 4 experimentos. AS, artesunato; SAL, salina; L-ARG, L-arginina.

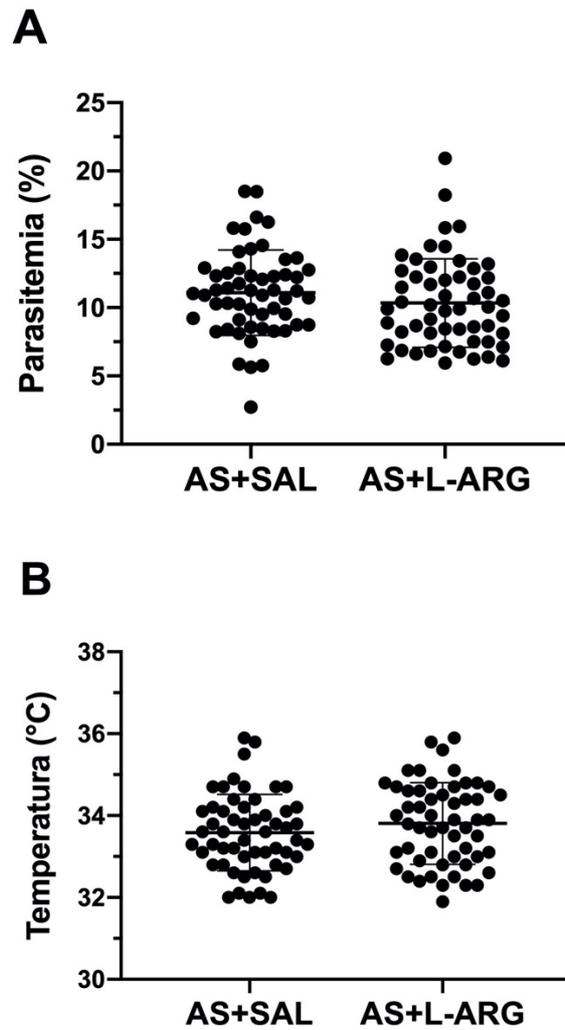


Figura 15 - Parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=55) ou artesunato mais L-arginina (n=55) no primeiro dia de tratamento.

Teste t não pareado bicaudal foi utilizado para a análise estatística dos dados. Não houve diferença significativa na parasitemia ($P=0.2176$) ou temperatura ($P= 0.2235$) entre os grupos no primeiro dia de tratamento. AS, artesunato; SAL, salina; L-ARG, L-arginina.

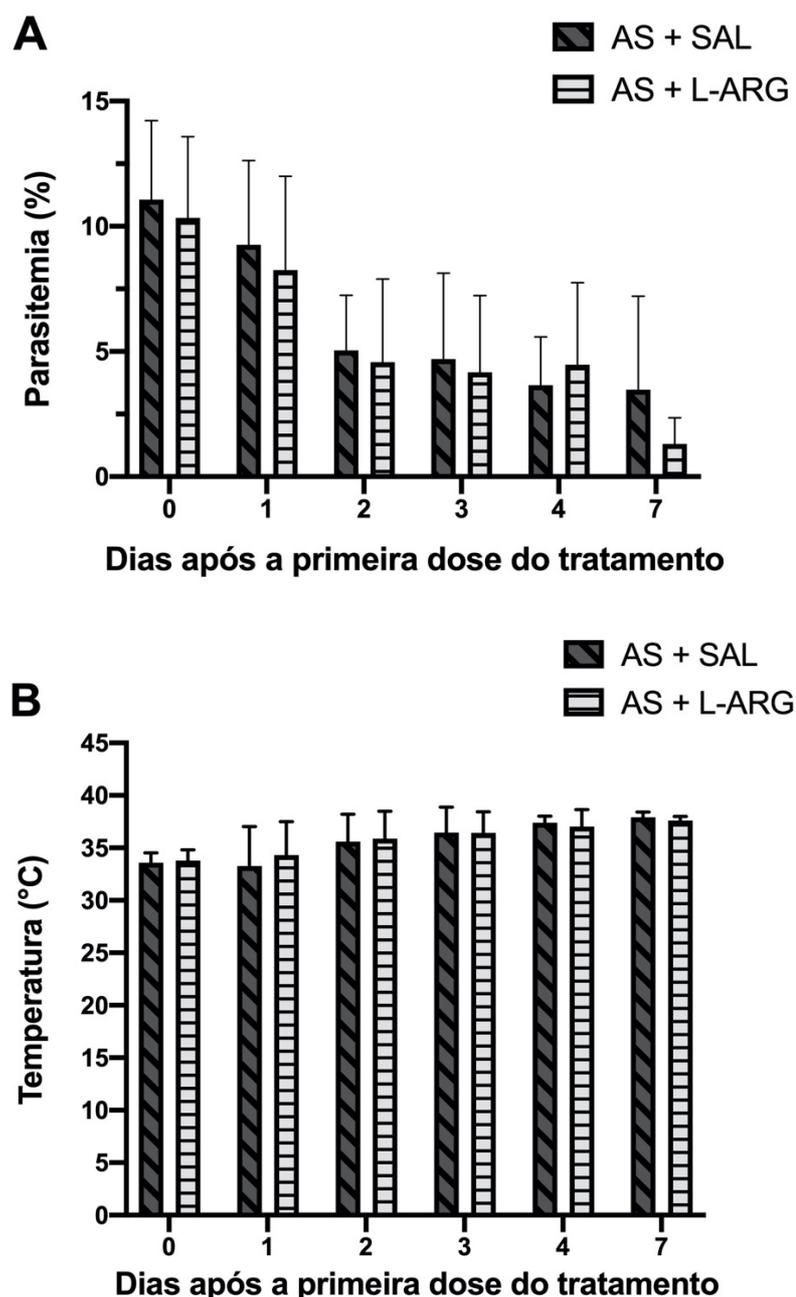


Figura 16 - Progressão temporal da parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=55) ou artesunato mais L-arginina (n=55). Teste *Two-way* ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados. Houve uma diminuição significativa na parasitemia ($P < 0,0001$) e um aumento significativo na temperatura ($P < 0,0001$) dos animais ao longo do tempo de tratamento, no entanto não houve diferença dessas duas variáveis entre os grupos tratados. AS, artesunato; SAL, salina; L-ARG, L-arginina.

4.3.5 Efeito da terapia adjuvante com o composto híbrido ART-NONO em animais com MCE

O objetivo da suplementação com L-arginina em animais com MCE é o de restaurar a produção endógena de NO, restaurando a função vascular. Em linha com essa estratégia, buscamos avaliar o efeito de um composto híbrido contendo um derivado de artemisinina com um doador de NO (denominado ART-NONO). Esse é

um dos compostos desenvolvidos por nosso grupo em parceria com o grupo de química medicinal da Universidade de Turim, Itália (BERTINARIA et al., 2015 e patente concedida). Em estudo anterior, foi demonstrado um benefício de um outro composto híbrido na sobrevida de animais com MCE (BERTINARIA et al., 2011). O composto que decidimos utilizar no presente estudo (ART-NONO) apresentou uma atividade vasodilatadora superior ao do composto anterior e, portanto, avaliou-se que o efeito de ART-NONO na sobrevida poderia ser também superior. Assim, animais que desenvolveram MCE foram selecionados para o estudo e tratados aleatoriamente com artesunato ou o composto híbrido ART-NONO. Ao contrário do esperado, animais que receberam somente artesunato apresentaram uma sobrevida maior (53%) do que aqueles tratados com ART-NONO (24%) (Figura 17), apesar de esses últimos terem apresentado temperaturas retais mais elevadas no momento em que receberam o tratamento (Figura 18 B). Entretanto, ao analisar a evolução da parasitemia pós-tratamento, observou-se que a eficácia do ART-NONO foi muito inferior à do artesunato, inclusive com um aumento da parasitemia nas primeiras 24 horas (Figura 19 A), e isso se refletiu também em uma recuperação mais lenta da temperatura retal (Figura 19 B). Isso explica a menor sobrevida no grupo de animais que recebeu ART-NONO, pois para que haja o efeito adjuvante do NO é condição fundamental a eficácia adequada do antimalárico, o que não ocorreu. Assim, esses dados levantam dúvidas com relação à estabilidade do composto devido ao intervalo entre a síntese na Itália, o envio e a realização do ensaio, e indicam a necessidade de se repetir o experimento com um novo lote com estabilidade assegurada.

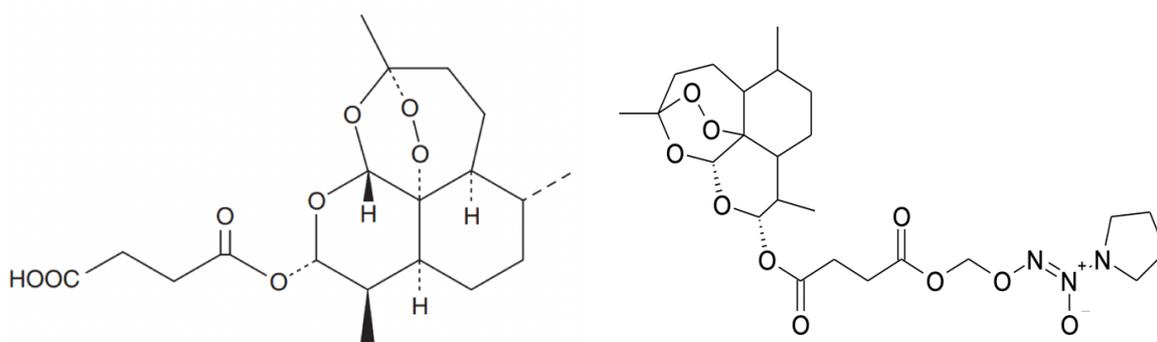
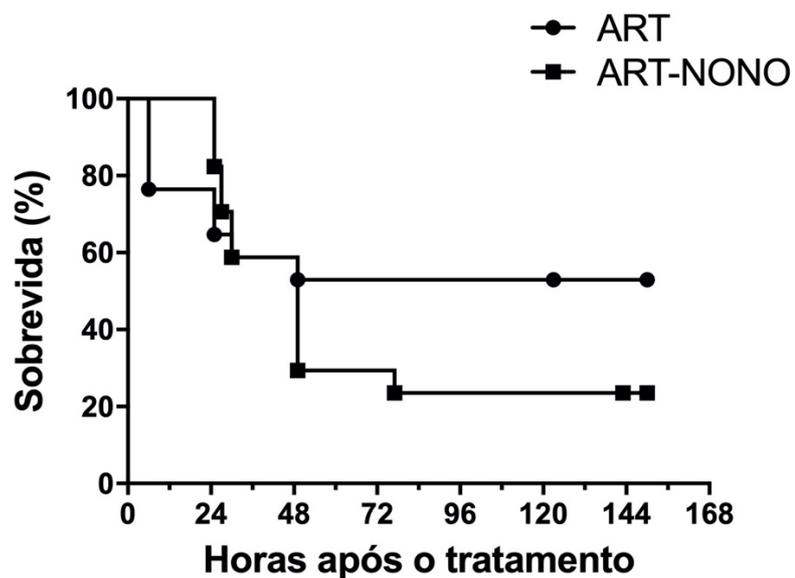


Figura 17 - Sobrevivida cumulativa de animais com MCE submetidos a tratamento com artesunato ou ART-NONO.

Animais que desenvolveram MCE foram tratados com artesunato (n=17) ou ART-NONO (n=17). Foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox) para a análise estatística dos dados. Apesar de a diferença não ser significativa, a baixa sobrevivida do grupo ART-NONO fez com que fosse tomada a decisão de não seguir adiante com essa abordagem. Abaixo do gráfico de sobrevivida encontra-se a estrutura química do artesunato (esquerda) e a do composto ART-NONO (direita). ART, artesunato; ART-NONO, artemisinina-doador de NO.

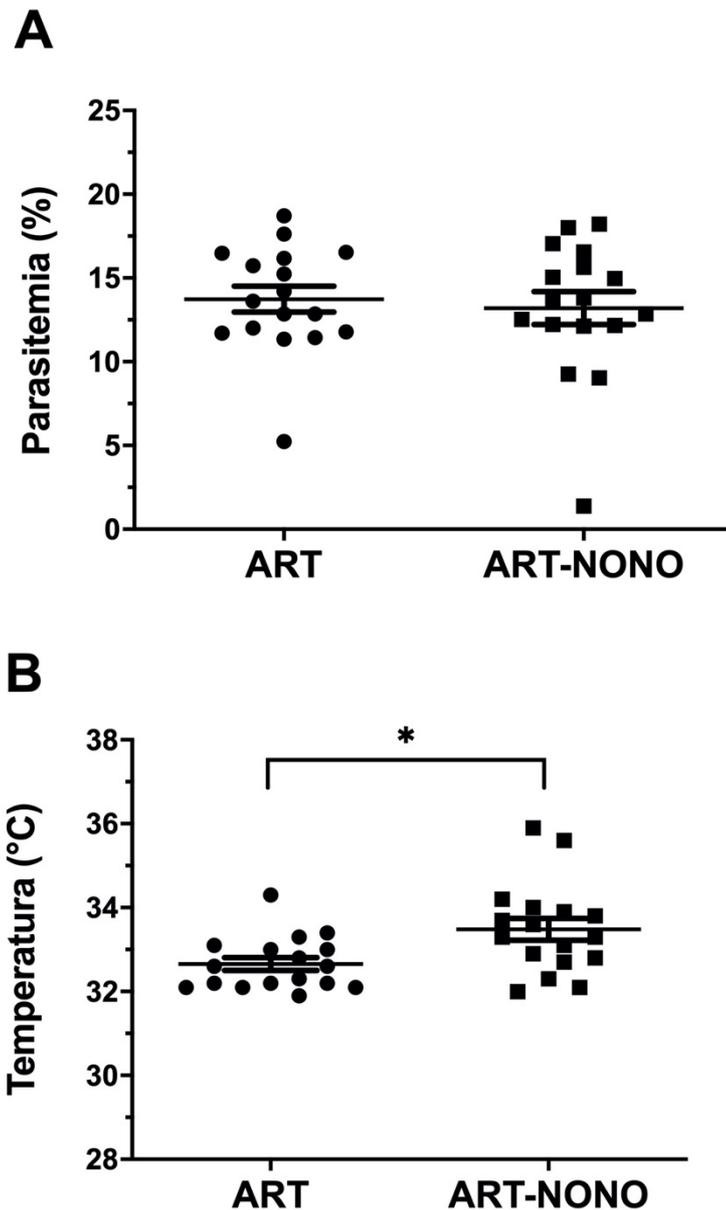


Figura 18 - Parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato (n=17) ou ART-NONO (n=17) no primeiro dia de tratamento.

Teste t não pareado bicaudal foi utilizado para a análise estatística dos dados. Não houve diferença significativa na parasitemia ($P=0.6717$) quando comparamos animais com MCE tratados com artesunato e aqueles que receberam ART-NONO no primeiro dia de tratamento. No entanto, animais tratados com ART-NONO apresentaram temperaturas significativamente mais elevadas do que animais que receberam apenas artesunato ($P=0.0105$) no primeiro dia de tratamento. ART, artesunato; ART-NONO, artemisinina-doador de NO.

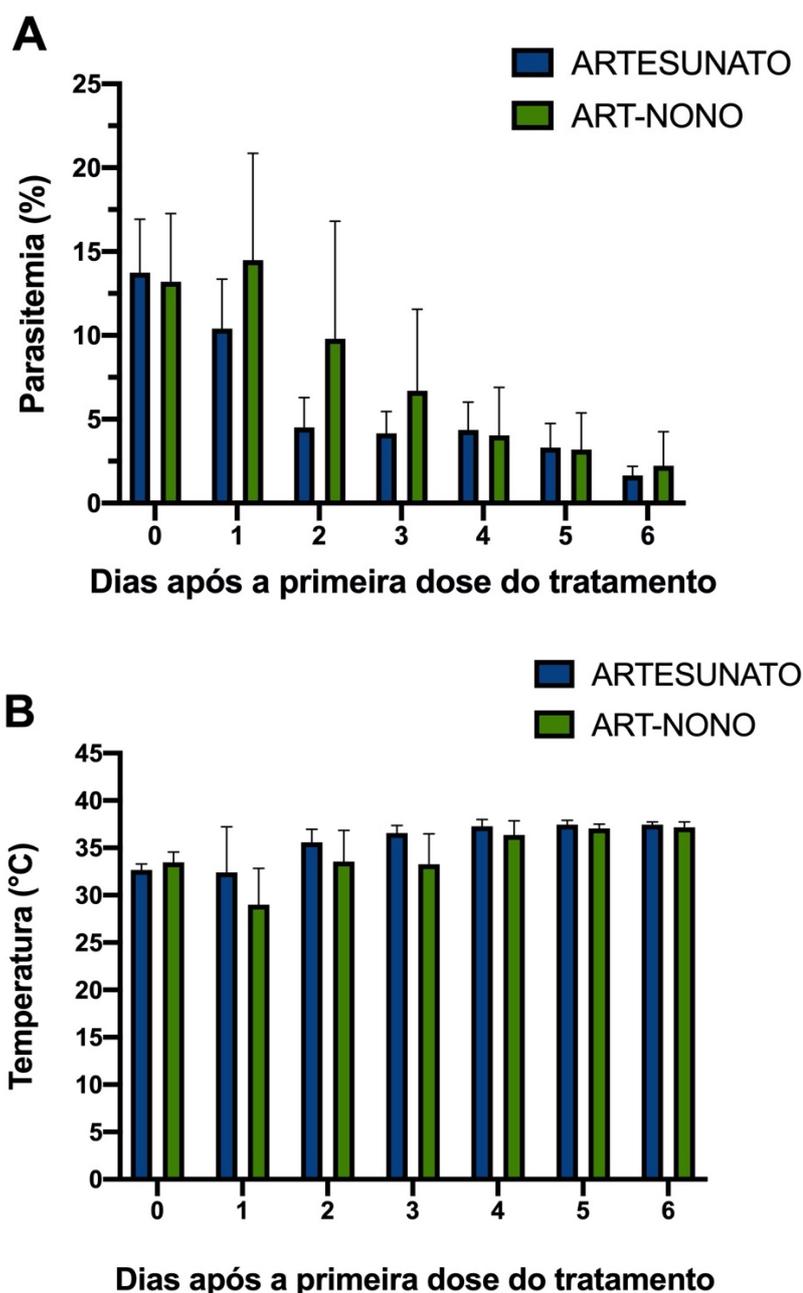


Figura 19 - Progressão temporal da parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato (n=17) ou ART-NONO (n=17).

Teste *Two-way* ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados. Houve uma diminuição significativa na parasitemia dos animais dias após a primeira dose do tratamento ($P < 0.0001$). No entanto, animais tratados somente com artesunato apresentaram uma redução mais rápida e mais intensa na parasitemia quando comparados aos animais que receberam ART-NONO ($P = 0.0245$). Aumento significativo na temperatura dos animais foi observado após o primeiro dia do tratamento ($P < 0.0001$). Animais tratados apenas com artesunato apresentaram recuperação mais rápida da temperatura do que os animais que receberam ART-NONO ($P = 0.0036$). ART, artesunato; ART-NONO, artemisinina-doador de NO.

4.4 Efeito da terapia adjuvante com ozagrel sobre a MCE

Em nossos estudos anteriores, havíamos demonstrado que, assim como a L-arginina, a administração de um inibidor da tromboxano sintase, o ozagrel, induzia aumento de fluxo sanguíneo cerebral em animais com MCE (Moreira AS, dissertação de mestrado). Assim, procedemos a uma exploração mais detalhada do efeito dessa intervenção na MCE.

4.4.1 Administração de ozagrel depleta tromboxano A₂ (TXA₂) no cérebro de animais com MCE

Alguns animais com MCE apresentaram níveis muito elevados de TXB₂ (metabólito estável de TXA₂) no cérebro, mas na média os níveis não foram diferentes dos níveis basais observados em animais controles não infectados (Figura 20). O tratamento com ozagrel, mas não com salina, levou a uma acentuada diminuição, superior a 80%, dos níveis cerebrais de TXA₂ nos animais com MCE (Figura 20). Esses dados, associados aos anteriores de fluxo sanguíneo cerebral, indicam que, mesmo que um aumento de TXA₂ não ajude a explicar o processo vasoconstritivo em animais com MCE, a inibição da produção basal de TXA₂ é uma intervenção eficaz em reverter a isquemia nessa síndrome neurológica.

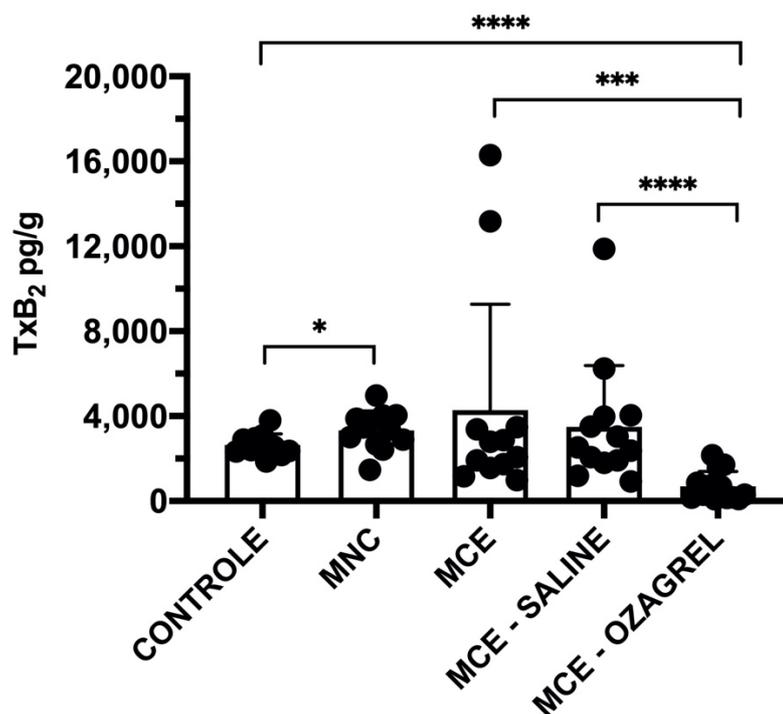


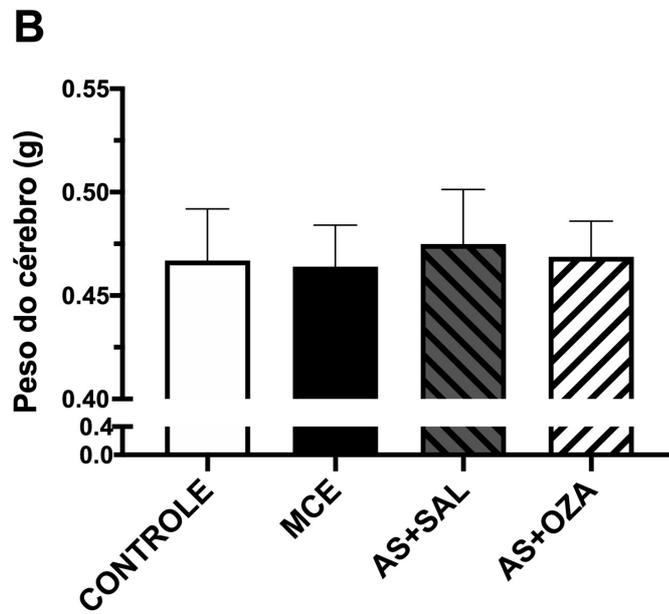
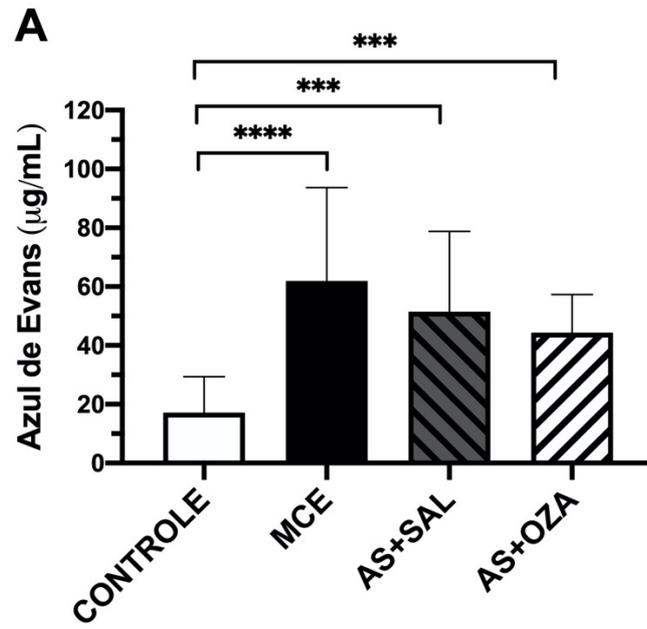
Figura 20 - Concentrações de TXA₂ (determinadas pela quantificação do seu derivado, TXB₂) em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com ozagrel.

Determinação das concentrações de TXB₂ (metabólito estável de TXA₂) no cérebro de animais controles não infectados, de animais com MNC (infectados por PbNK65) e de animais com MCE (infectados por PbA) antes e após 1 hora do tratamento com salina ou ozagrel. Teste *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Não foram observadas diferenças nos níveis de TXB₂ quando comparados animais controles não infectados (n=11) e aqueles com MCE antes (n=12) ou após intervenção com salina (n=13). Animais com MNC (n=12) apresentaram aumento nas concentrações cerebrais de TXB₂ quando comparados a animais controles não infectados (P=0.0225). Queda significativa nos níveis de TXB₂ foi observada no cérebro de animais tratados com ozagrel (n=13) quando comparados ao grupo MCE antes (P=0.0001) ou após intervenção com salina (P<0.0001). MNC, malária não cerebral; MCE, malária cerebral experimental; TXB₂, tromboxano B₂; SAL, salina; OZA, ozagrel - inibidor da enzima tromboxano sintase.

4.4.2 Terapia adjuvante com ozagrel não afeta a permeabilidade da barreira hematoencefálica em animais com MCE

Animais que desenvolveram MCE no sexto dia após a infecção foram selecionados para o estudo e aleatoriamente tratados com artesunato combinado com salina ou ozagrel (100mg/kg). Cinco horas após o tratamento, os animais receberam o corante azul de Evans por via intravenosa. Após uma hora de circulação do corante, os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram o cérebro coletado. Como observado anteriormente no tratamento com L-arginina, animais que desenvolveram MCE apresentaram aumento significativo no extravasamento do corante azul de Evans para o tecido cerebral quando comparados ao grupo controle não infectado, indicando quebra da barreira hematoencefálica, e o tratamento com artesunato mais salina ou ozagrel não teve qualquer efeito sobre a intensidade de extravasamento do corante (Figura 21 A) 6 horas após o tratamento. Não foram observadas diferenças

significativas no peso do cérebro dos animais com MCE antes ou após os tratamentos quando comparados ao grupo controle não infectado (Figura 21 B). A parasitemia dos animais diminuiu seis horas após o tratamento com artesunato mais salina ou ozagrel (Figura 21 C). No entanto, não houve diferença nas parasitemias quando comparamos os diferentes grupos tratados.



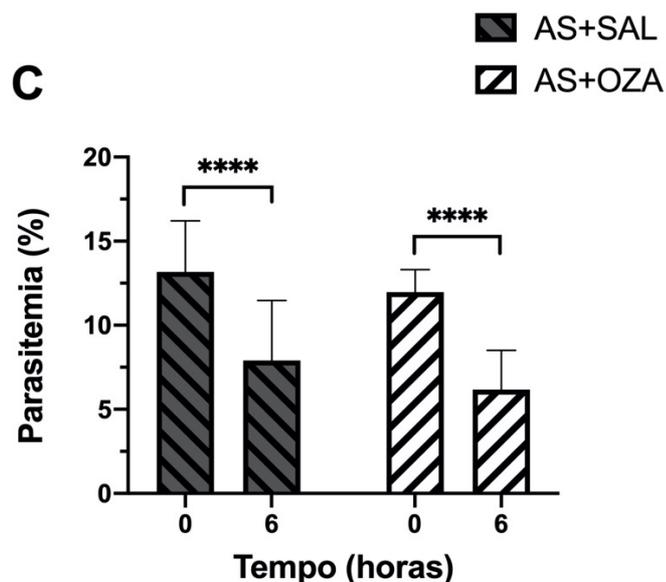


Figura 21 - Permeabilidade da barreira hematoencefálica, peso do cérebro e parasitemia antes e após tratamento com artesunato mais salina ou ozagrel.

A- Concentração do corante azul de Evans extravasado para o parênquima cerebral de animais com MCE antes e após tratamento. Teste *One-way* ANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Aumentada permeabilidade vascular (maior concentração do corante azul de Evans no tecido cerebral) foi observada em animais com MCE não tratados ($n=14$; $P<0.0001$), tratados com artesunato mais salina ($n=15$; $P=0.0002$) ou ozagrel ($n=8$; $P=0.0003$) quando comparados ao grupo controle não infectado ($n=15$). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos infectados tratados ou não. **B** - Peso do cérebro de animais controles não infectados e animais com MCE antes e após o tratamento com artesunato mais salina ou ozagrel. Teste *One-way* ANOVA com pós-teste Kruskal-Wallis e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Não houve diferença significativa no peso do cérebro entre os grupos. **C** - Efeito do tratamento com artesunato sobre a parasitemia de animais com MCE tratados com artesunato mais salina ou ozagrel. Teste *Two-way* ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados. O tratamento com artesunato reduziu em aproximadamente 40% a parasitemia dos animais nos dois grupos após 6 horas do tratamento ($P < 0.0001$). Um total de 4 experimentos foi realizado para obtenção dos resultados. MCE, malária cerebral experimental; AS, artesunato; SAL, salina; OZA, ozagrel.

4.4.3 Efeito da terapia adjuvante com ozagrel na sobrevivência de animais com MCE

Animais que desenvolveram MCE foram selecionados para o estudo e tratados aleatoriamente com artesunato combinado com salina ou com ozagrel (100mg/kg em salina). A figura 22 sugere a ocorrência de uma sobrevivência maior no grupo que recebeu artesunato mais ozagrel (75%) comparado ao grupo tratado com artesunato mais salina (50%). Entretanto, esses dados foram inconclusivos, pois o n amostral nesse experimento único não permitiu determinar se a diferença é de fato verdadeira ($P=0.2434$). Além disso, a temperatura retal dos animais no grupo tratado com artesunato mais ozagrel indica que esses animais podiam estar ligeiramente em melhores condições clínicas que os do grupo que recebeu artesunato mais salina ($P=0.0703$) (Figura 23 B). A figura 24 mostra a porcentagem de parasitemia (Figura 24 A) e a

temperatura (Figura 24 B) dos animais ao longo do tempo de tratamento. A parasitemia diminuiu para menos da metade 24 horas após o início do tratamento e estava praticamente zerada no tempo de 48 horas, enquanto as temperaturas aumentaram nesse mesmo período. Não houve diferença significativa quando comparamos as parasitemias dos animais tratados com artesunato mais salina com aqueles que receberam artesunato mais ozagrel. No entanto, animais tratados com artesunato mais ozagrel apresentaram uma melhora mais rápida na temperatura corporal (48 horas após o início do tratamento) quando comparados àqueles que receberam artesunato mais salina.

O experimento chegou a ser repetido, mas um problema no nosso termômetro retal não permitiu definir com segurança o momento adequado para o tratamento e foi interrompido. Não houve tempo para corrigir o problema e conduzir outros experimentos e, assim, esses dados precisam ainda de confirmação.

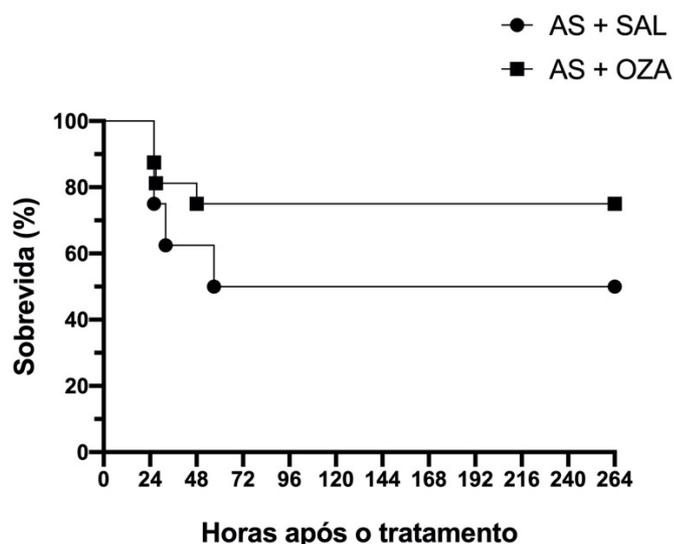


Figura 22 - Sobrevida cumulativa de animais com MCE submetidos a tratamento com artesunato mais salina ou ozagrel.

Animais que desenvolveram MCE foram tratados com artesunato mais salina (n=8) ou artesunato mais ozagrel (n=16). Foi utilizado o teste de Log-rank (Mantel-Cox) para a análise estatística dos dados. O grupo que recebeu artesunato mais ozagrel apresentou uma sobrevida maior (75%; apesar de não ser estatisticamente significativa-P=0.2434) quando comparado ao grupo que recebeu artesunato mais salina (50%). AS, artesunato; SAL, salina; OZA, ozagrel.

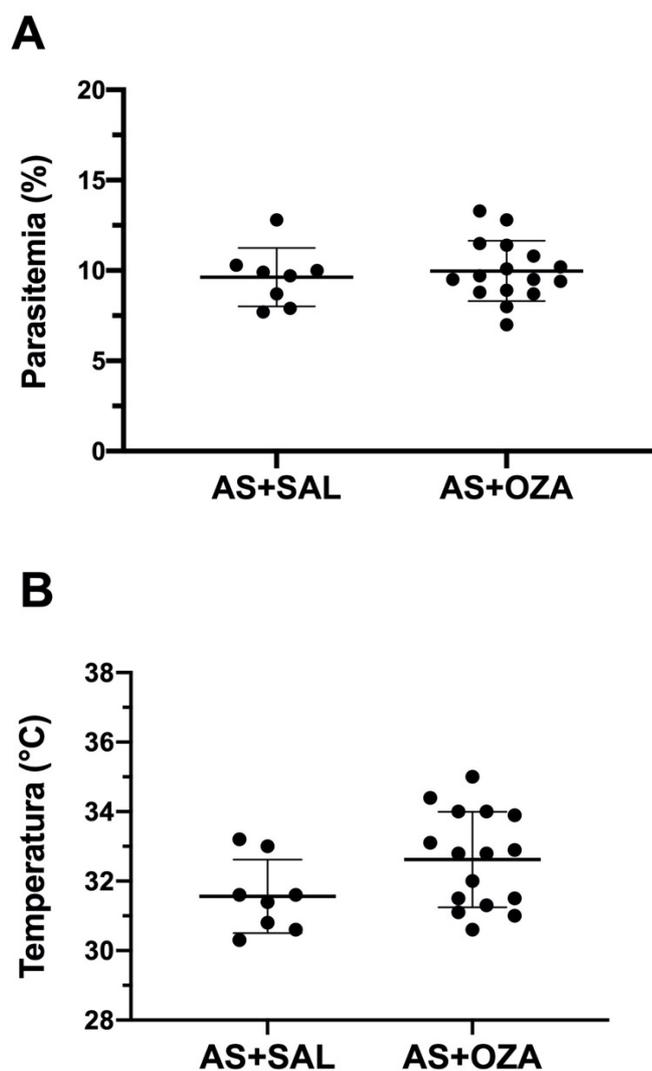


Figura 23 - Parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=8) ou artesunato mais ozagrel (n=16) no primeiro dia de tratamento. Teste t não pareado bicaudal foi utilizado para a análise estatística dos dados. Não houve diferença significativa na parasitemia (P=0.6300) ou temperatura (0.0703) entre os grupos no primeiro dia de tratamento. AS, artesunato; SAL, salina; OZA, ozagrel.

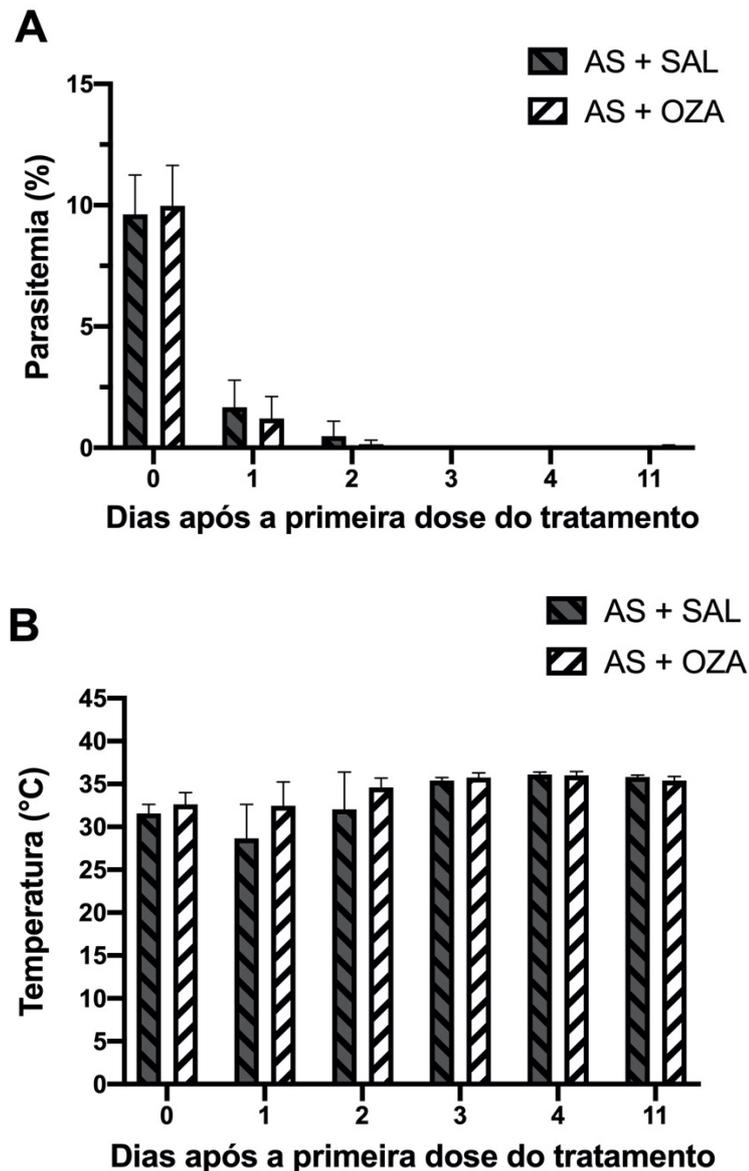


Figura 24 - Progressão temporal da parasitemia (A) e temperatura corporal (B) de animais com MCE tratados com artesunato mais salina (n=8) ou artesunato mais ozagrel (n=16).

Teste *Two-way* ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados. Houve uma diminuição significativa na parasitemia ($P < 0.0001$) e um aumento significativo na temperatura ($P < 0.0001$) dos animais em relação ao tempo de tratamento. Não houve diferença nas parasitemias entre os diferentes grupos tratados. No entanto, o grupo que recebeu artesunato mais ozagrel apresentou um aumento significativo ($P = 0.0025$) na temperatura corporal principalmente nas primeiras 48h após o início do tratamento quando comparado ao grupo tratado com artesunato mais salina. AS, artesunato; SAL, salina; OZA, ozagrel.

4.5 Determinação dos níveis de eicosanoides no tecido cerebral

Metabólitos do ácido araquidônico possuem importante papel na regulação do tônus vascular no sistema nervoso central. Uma vez que animais com MCE apresentam um processo vasoconstritivo (CABRALES et al., 2010), nós perguntamos se uma eventual desregulação dos níveis de alguns eicosanoides poderia estar

associada a esse processo. Para tal, avaliamos por ELISA os níveis de eicosanoides selecionados no cérebro de animais com MCE e comparamos com animais controles não infectados e também com animais infectados por uma cepa de *Plasmodium berghei* (PbNK65) que não causa malária cerebral (grupo denominado de 'malária não cerebral', MNC). Animais controles e animais dos grupos MCE e MNC tiveram seus cérebros coletados no sexto dia após a infecção, processados e então foram determinadas as concentrações de dois dos principais eicosanoides vasoconstritores (TXA₂ e 20-HETE - foi feito o ensaio também com LTB₄, mas os valores ficaram fora da curva padrão e não foi possível determinar as concentrações), de dois dos principais vasodilatadores (14,15-EET e PGE₂), além dos níveis de 14,15-DHET (que mensura catabolismo aumentado de 14,15-EET, indicando decréscimo da atividade vasodilatadora do mesmo) e 8-isoprostanos (um potente vasoconstritor, resultante de metabolismo oxidativo não enzimático do ácido araquidônico, e que indica ambiente pró-oxidante). Os níveis desses metabólitos também foram avaliados em animais com MCE tratados com drogas inibidoras específicas: níveis de TXA₂, PGE₂ e 8-isoprostanos em animais tratados com ozagrel (inibidor de tromboxano sintase), níveis de 20-HETE em animais tratados com HET0016 (inibidor de CYP4A), níveis de 14,15-EET e 14,15-DHET em animais tratados com AUDA (inibidor de epóxido hidrolase solúvel).

Como descrito acima, os níveis de TXA₂ no cérebro não se mostraram alterados em animais com MCE, mas de qualquer maneira o tratamento com ozagrel levou a uma queda acentuada dos níveis desse metabólito no cérebro de animais com a síndrome neurológica (Figura 20).

Animais com MCE apresentaram aumento marcante nos níveis de 20-HETE quando comparados aos animais controles não infectados e animais com MNC (Figura 25 A). A administração de HET0016 levou a uma redução importante dos níveis de 20-HETE uma hora após a administração (Figura 25 B). Nesse experimento, o veículo utilizado foi etanol+polietilenoglicol+salina (2:2:6 [v/v]), que não interferiu com os níveis de 20-HETE. De maneira interessante, em um primeiro experimento, a diluição da droga foi feita com veículo contendo 5% de DMSO em salina, e esse veículo levou a uma drástica redução dos níveis de 20-HETE (Figura 25 A).

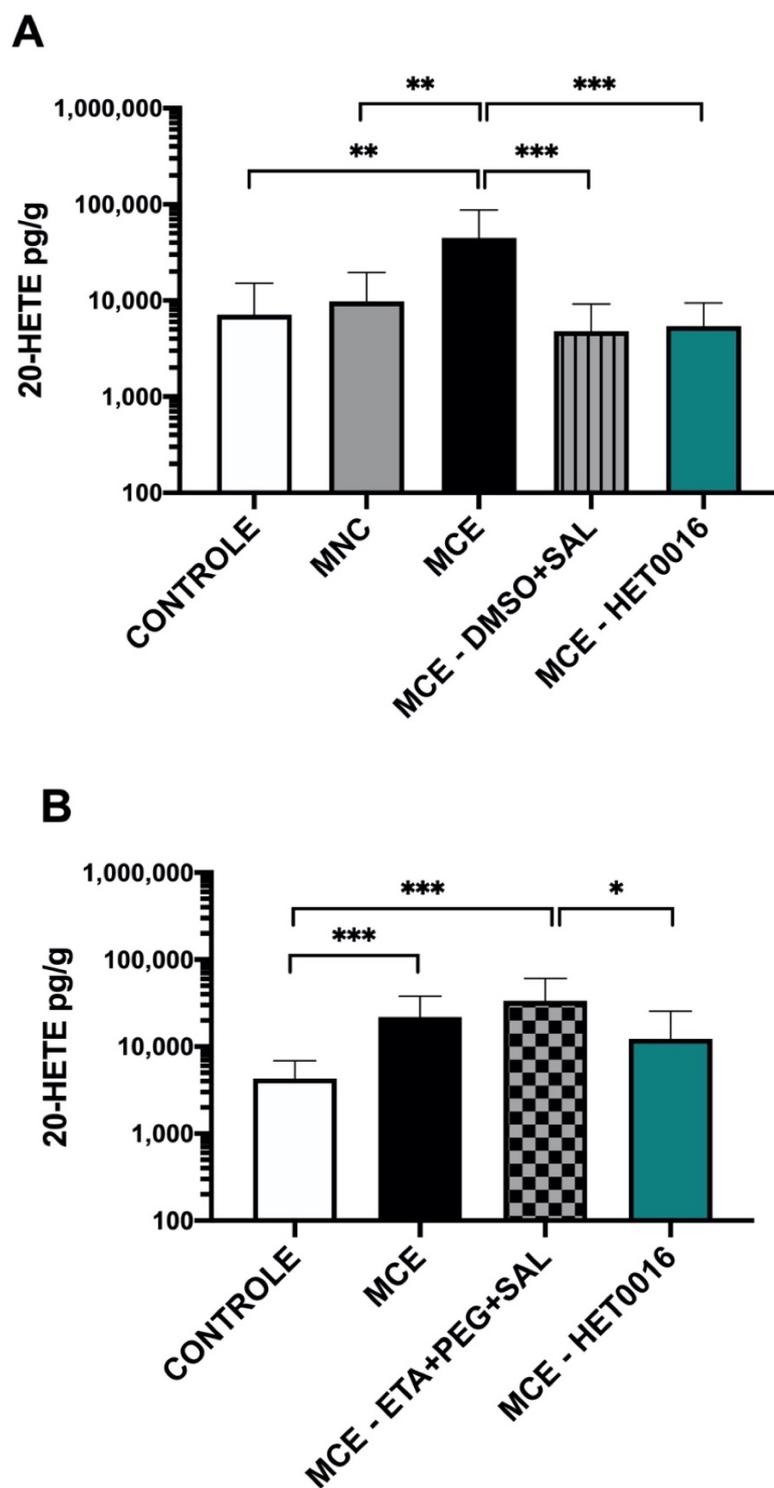


Figura 25 - Concentrações de 20-HETE em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com HET0016.

A - Determinação das concentrações de 20-HETE no cérebro de animais controles não infectados, de animais com MNC (infectados por PbNK65) e de animais com MCE (infectados por PbA) antes e após 1 hora do tratamento com DMSO mais salina ou HET0016. Teste *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Os níveis do eicosanoide vasoconstritor 20-HETE foram significativamente maiores em animais que desenvolveram MCE (n=7) quando comparados a animais controles não infectados (n=9; P=0.0021) e animais que desenvolveram MNC (n=13; P=0.0024). Os níveis de 20-HETE em animais com MCE diminuíram após intervenção com veículo (DMSO+salina; n=9) ou com HET0016 (dissolvido em DMSO+salina; n=9) quando comparados aos níveis de 20-HETE em animais com MCE antes do tratamento (P=0.0003 e 0,0002, respectivamente). **B** - Determinação das concentrações de 20-HETE no cérebro de animais controles não infectados e de animais com MCE (infectados por PbA) antes e após 1 hora do tratamento com etanol mais polietilenoglicol mais salina ou HET0016. Teste *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Os níveis de 20-HETE foram significativamente maiores em animais com MCE antes (n=10) e após intervenção com veículo (etanol + polietilenoglicol + salina, n=11) quando comparados aos níveis em animais controles não infectados (n= 8; P=0.0005 e 0.0001, respectivamente). Os níveis de 20-HETE foram significativamente reduzidos em animais tratados com HET0016 (dissolvido em etanol + polietilenoglicol + salina; n=12) quando comparados ao grupo com MCE após a intervenção com veículo (P=0.0156). MNC, malária não cerebral; MCE, malária cerebral experimental; 20-HETE, 20-hydroxyeicosatetraenoic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; ETA, etanol; PEG, polietilenoglicol; SAL, salina; HET0016, inibidor da produção de 20-HETE.

Animais com MCE, assim como animais com MNC, apresentaram uma queda nos níveis de 14,15-EET no cérebro em relação a controles não infectados (Figura 26). A administração de AUDA não resultou em alteração significativa dos níveis de EET em animais com MCE, em relação a animais tratados com o veículo.

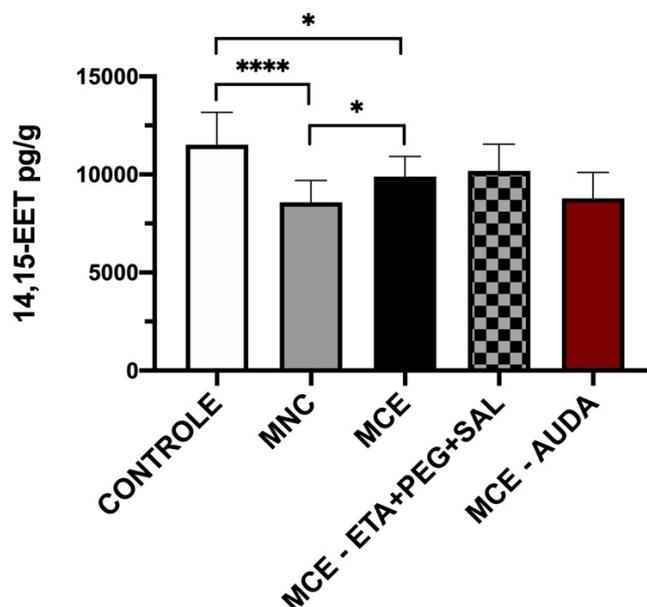


Figura 26 - Concentrações de 14,15-EET em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com AUDA.

Determinação das concentrações de 14,15-EET no cérebro de animais controles não infectados, de animais com MNC (infectados por PbNK65) e de animais com MCE (infectados por PbA) antes e após 1 hora do tratamento com etanol mais polietilenoglicol mais salina ou AUDA. Teste *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Animais com MCE (n=11) e animais com MNC (n=9) apresentaram queda nos níveis de 14,15-EET no cérebro quando comparados ao grupo controle não infectado (n=8; P=0.0259 e P<0.0001, respectivamente). AUDA não alterou significativamente os níveis de 14,15-EET em animais com MCE quando comparados ao grupo que recebeu apenas o veículo. MNC, malária não cerebral; MCE, malária cerebral experimental; 14,15-EET, 14,15-epoxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic acid; ETA, etanol; PEG, polietilenoglicol; SAL, salina; AUDA, inibidor da enzima epóxido hidrolase solúvel.

De maneira contrária a 14,15-EET, os níveis de 14,15-DHET estavam aumentados no cérebro de animais com MCE quando comparados ao grupo MNC (Figura 27). Nós procuramos avaliar o efeito da administração de AUDA (inibidor da epóxido hidrolase solúvel, responsável pela conversão de EET em DHET) também nos níveis de 14,15-DHET. Em um primeiro experimento, utilizando como veículo DMSO 5% em salina, de maneira semelhante ao ocorrido no experimento com HET0016, observou-se uma drástica redução dos níveis de 14,15-DHET tanto nos animais que receberam AUDA quanto naqueles que receberam apenas o veículo (Figura 27). Assim, conduzimos um segundo experimento utilizando como veículo etanol+polietilenoglicol+salina (2:2:6 [v/v]), entretanto nesse experimento os valores de absorbância no ELISA ficaram fora dos limites da curva padrão e não foi possível determinar o efeito do tratamento com AUDA sobre os níveis de 14,15-DHET.

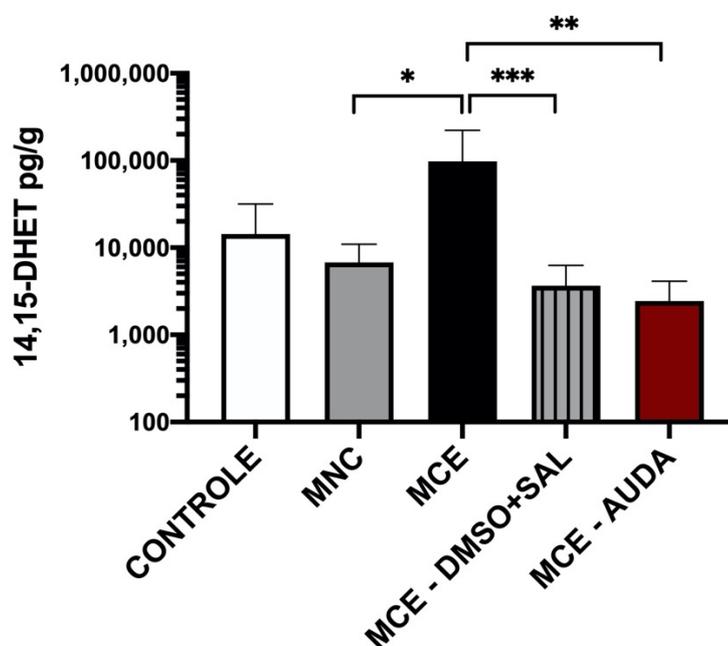


Figura 27 - Concentrações de 14,15-DHET em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com AUDA.

Determinação das concentrações de 14,15-DHET no cérebro de animais controles não infectados, de animais com MNC (infectados por PbNK65) e de animais com MCE (infectados por PbA) antes e após 1 hora do tratamento com DMSO mais salina ou AUDA. Teste *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Animais com MCE (n=6) apresentaram níveis de 14,15-DHET no cérebro maiores do que no grupo MNC (n=5; P=0.0173). Os níveis cerebrais de 14,15-DHET diminuíram em animais com MCE tratados com veículo (DMSO+salina; n= 9) ou com AUDA (dissolvido em DMSO+salina; n=7) quando comparados aos níveis de 14,15-DHET em animais com MCE antes do tratamento (P=0.0008 e 0.0012, respectivamente). MNC, malária não cerebral; MCE, malária cerebral experimental; 14,15-DHET, 14,15-dihydroxy-5Z,8Z, 11Z-eicosatrienoic acid; DMSO, dimethyl sulfoxide; SAL, salina; AUDA, inibidor da enzima epóxido hidrolase solúvel.

Já os níveis de PGE₂ estavam aumentados no cérebro de animais com MNC quando comparados ao grupo controle não infectado e também em relação ao grupo MCE (Figura 28). Nós observamos previamente que o tratamento de animais com

MCE com ozagrel, um inibidor de tromboxano sintase, causava depleção de TXA_2 . Uma vez que tanto a tromboxano sintase quanto a PGE sintase utilizam como substrato a PGH_2 , derivada do metabolismo de AA pela cicloxigenase (Figura 2) nós perguntamos se a inibição da síntese de TXA_2 pelo ozagrel poderia impactar na geração de PGE_2 , pelo suposto aumento da disponibilidade de PGH_2 . Entretanto, isso não ocorreu, os níveis de PGE_2 em animais com MCE tratados com ozagrel não foram diferentes daqueles observados em animais que receberam apenas o veículo (salina) (Figura 28).

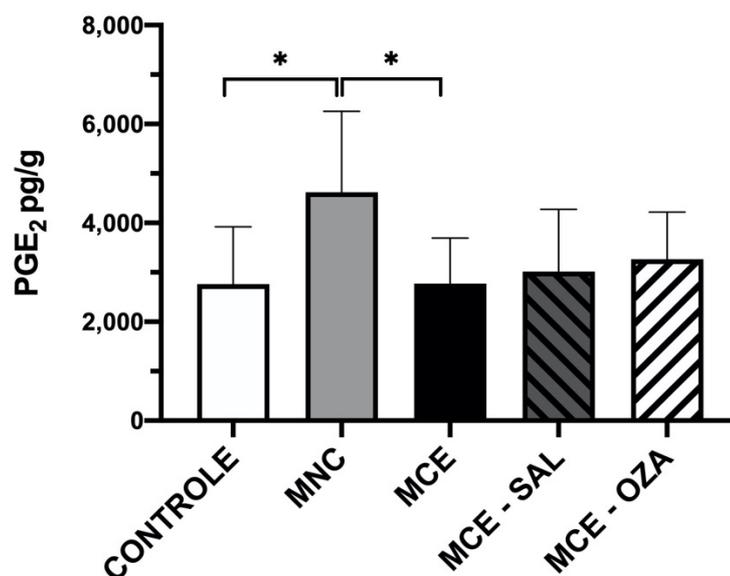


Figura 28 - Concentrações de PGE_2 em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com ozagrel.

Determinação das concentrações de PGE_2 no cérebro de animais controles não infectados, de animais com MNC (infectados por PbNK65) e de animais com MCE (infectados por PbA) antes e após 1 hora do tratamento com salina ou ozagrel. Teste *One-way ANOVA* e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Animais com MNC (n=6) apresentaram níveis aumentados do potente vasodilatador PGE_2 no tecido cerebral quando comparados ao grupo MCE (n=9; P= 0.0176) e a controles não infectados (n= 9; P= 0.0496). Não foram observadas diferenças nos níveis de PGE_2 no cérebro de animais com MCE tratados com ozagrel (n=5) quando comparados ao grupo que recebeu apenas veículo (n=5). MNC, malária não cerebral; MCE, malária cerebral experimental; PGE_2 , prostaglandina E_2 ; SAL, salina; OZA, ozagrel - inibidor da enzima tromboxano sintase.

Os níveis de 8-isoprostanos encontravam-se aumentados tanto em animais que desenvolveram MCE quanto em animais com MNC, quando comparados ao grupo controle (Figura 29). Nós perguntamos novamente se o tratamento com ozagrel poderia influenciar nos níveis de 8-isoprostanos em animais com MCE e, de fato, o tratamento com ozagrel levou a uma diminuição dos níveis desse metabólito no cérebro (Figura 29).

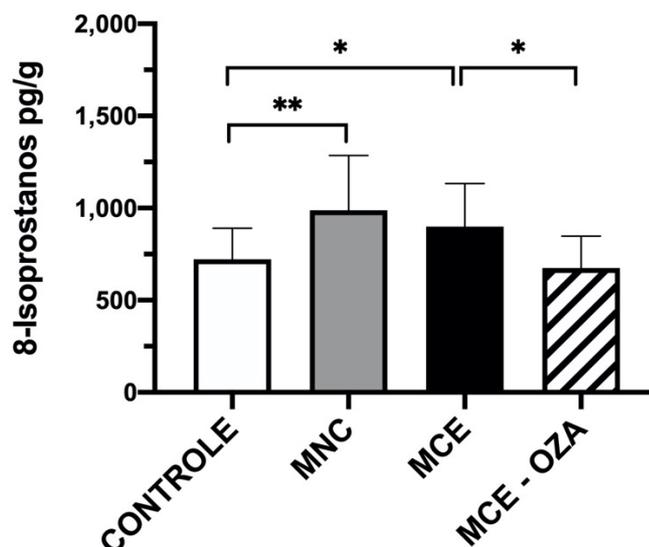


Figura 29 - Concentrações de 8- isoprostanos em cérebro de animais com MCE antes e após tratamento com ozagrel.

Determinação das concentrações de 8-isoprostanos no cérebro de animais controles não infectados, de animais com MNC (infectados por PbNK65) e de animais com MCE (infectados por PbA) antes e após 1 hora do tratamento com ozagrel. Teste *One-way* ANOVA e teste *t-Student* com correção Mann-Whitney foram utilizados para a análise estatística dos dados. Os níveis de 8-isoprostanos estavam aumentados em animais com MCE (n=17) e animais com MNC (n=21) quando comparados ao grupo controle não infectado (n=15; P=0.0402 e P=0.0024, respectivamente). O tratamento dos animais que desenvolveram MCE com ozagrel (n=5) diminuiu os níveis cerebrais de 8-isoprostanos quando comparados aos animais com MCE antes do tratamento (P=0.0477). MNC, malária não cerebral; MCE, malária cerebral experimental; OZA, ozagrel - inibidor da enzima tromboxano sintase.

Esses resultados indicam que animais com MCE apresentam, de fato, um perfil de metabolismo de AA pendendo para um desbalanço que favorece a produção de eicosanoides vasoconstritores (20-HETE, 14,15-DHET, 8-isoprostanos), em detrimento da produção dos eicosanoides vasodilatadores (PGE₂, 14,15-EET), o que poderia contribuir para isquemia tecidual, hipóxia e, conseqüentemente, levar a morte nessa síndrome neurológica. Indicam também que tratamentos com drogas inibidoras de enzimas relacionadas às vias de metabolismo do AA, administradas sistemicamente, podem interferir na produção desses metabólitos no cérebro, tornando-se assim, além de ferramentas úteis para estudo dos mecanismos de patogenia, drogas com potencial terapêutico na malária cerebral. O efeito de ozagrel, inibindo a produção de TXA₂ (e também de 8-isoprostanos) e, concomitantemente, levando a um aumento substancial do fluxo sanguíneo cerebral em animais com MCE, sugere que esse potencial pode ser explorado.

4.6 Avaliação *ex vivo* da reatividade vascular

Esses experimentos foram conduzidos no *Laboratory of Malaria and Vector Research* (LMVR), no *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID), do *National Institutes of Health* (NIH), em Rockville, EUA, sob a orientação do Dr. Hans Ackerman, durante um estágio de doutorado sanduíche. Nosso grupo havia demonstrado anteriormente, em estudos *in vivo* utilizando microscopia intravital do cérebro, que os vasos da microcirculação cerebral (pia-máter) de animais com MCE não respondiam a estímulos vasodilatadores pela superfusão de acetilcolina (que induz vasodilatação por mecanismo dependente de NOS endotelial) ou de N-metil-D-aspartato (NMDA, que induz vasodilatação dependente de NOS neuronal) (ONG et al., 2013). Os estudos *in vivo* permitem avaliar, por exemplo, a função vascular no contexto global de todos os *players* que afetam determinada resposta, por exemplo, o próprio vaso sanguíneo com circulação sanguínea ativa, na presença da infecção plasmoidal, afetado pela resposta imune em curso, o processo pró-inflamatório e pró-oxidante, a interação com o ambiente do sistema nervoso central, os neurônios, astrócitos e seus mediadores, etc. A questão que levantamos era até que ponto a disfunção vascular observada nos animais com MCE, em estudos *in vivo*, era intrínseca do vaso ou dependente de outros fatores, como por exemplo fatores plasmáticos ou o próprio ambiente cerebral. Para isso, decidimos lançar mão de um sistema *ex vivo* de miografia, que nos permite estudar a reatividade vascular de forma isolada, em um equipamento apropriado. Nossa hipótese inicial era a de que as artérias cerebrais de animais com MCE teriam um defeito intrínseco relacionado à disfunção de NOS endotelial, que faria com que o vaso não produzisse NO de forma adequada quando estimulado, por exemplo, com acetilcolina ou análogos como a metacolina. Uma vez confirmada essa hipótese, planejamos uma série de abordagens para estudar esse mecanismo e explorar intervenções terapêuticas.

Assim, a reatividade vascular foi avaliada por miografia da artéria cerebral média (*middle cerebral artery* - MCA) obtida de camundongos controles não infectados e animais com MCE no sexto dia após a infecção. A resposta vascular foi avaliada frente a estímulos vasodilatadores dependentes (metacolina; *methacholine* - MCh) e independentes (nitroprussiato de sódio; *sodium nitroprusside* - SNP) de endotélio, e a resposta vasoconstritora foi avaliada frente a serotonina (*serotonin/5-hydroxytryptamine* - 5-HT). Essas avaliações foram feitas em múltiplas concentrações de cada estímulo, na presença ou ausência de N^{ω} -nitro-L-arginine methyl ester (L-

NAME, inibidor de NOS). Avaliou-se tanto as mudanças de diâmetro interno quanto externo dos vasos.

As artérias cerebrais de animais controles não infectados apresentaram, como esperado, potente resposta vasodilatadora ao estímulo com metacolina (Figura 30 A e B) e com nitroprussiato de sódio (Figura 30 C e D), atingindo cerca de 15% de aumento no diâmetro interno e 10% no diâmetro externo nas concentrações mais elevadas (10^{-5} e 10^{-4} M). Já o estímulo com serotonina levou a constrição das MCAs (Figura 30 E e F). De maneira contrária às nossas expectativas, as MCAs de animais com MCE apresentaram resposta vasodilatadora à metacolina semelhante à de animais controles não infectados (Figura 30 A e B). E no caso do nitroprussiato de sódio, a resposta vasodilatadora foi até mesmo mais intensa (diâmetro interno) nas MCAs de animais com MCE do que nas MCAs de animais controles não infectados (Figura 30 C). A resposta constritora à serotonina de MCAs de animais com MCE também foi similar à de animais controles não infectados (Figura 30 E e F).

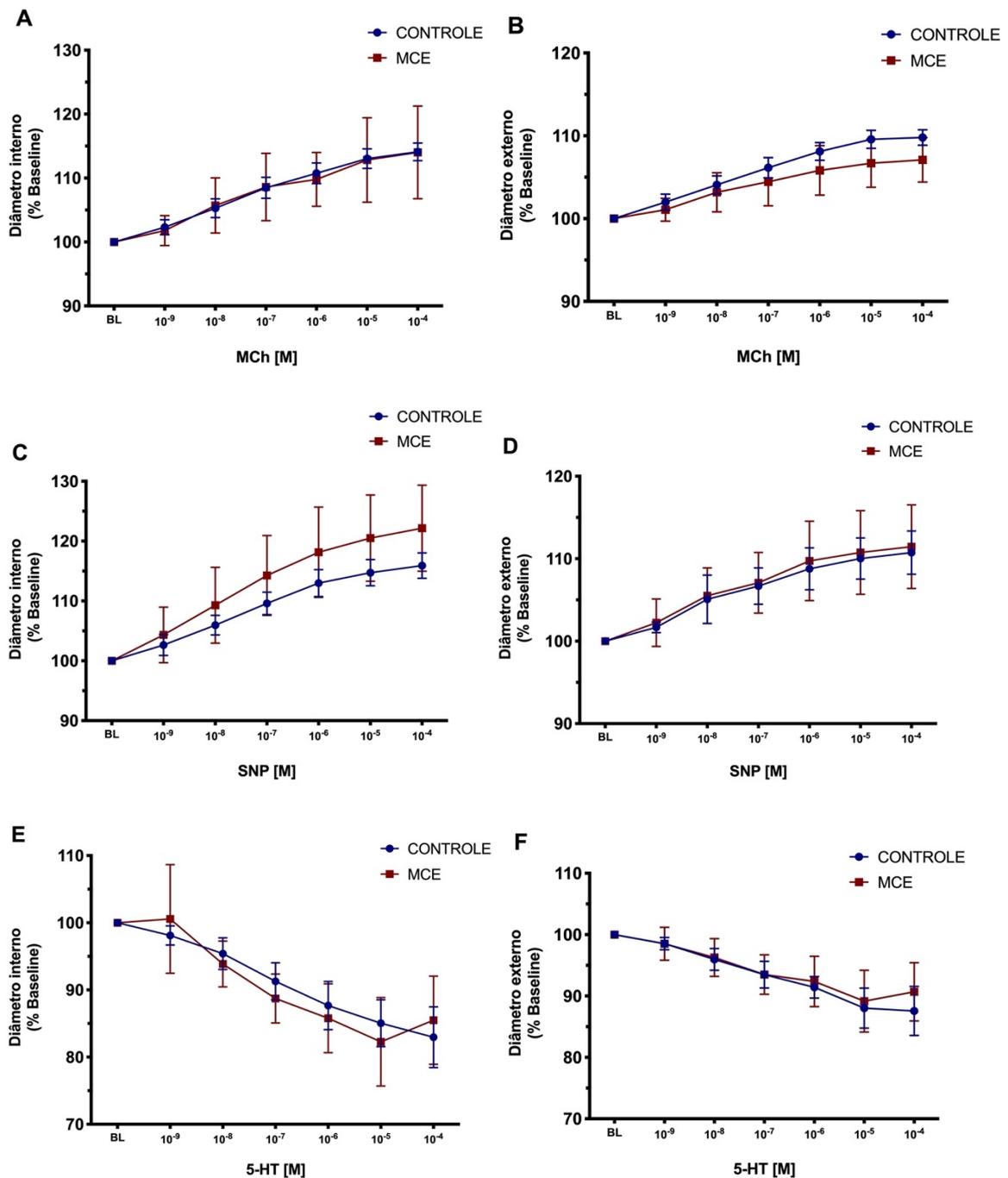
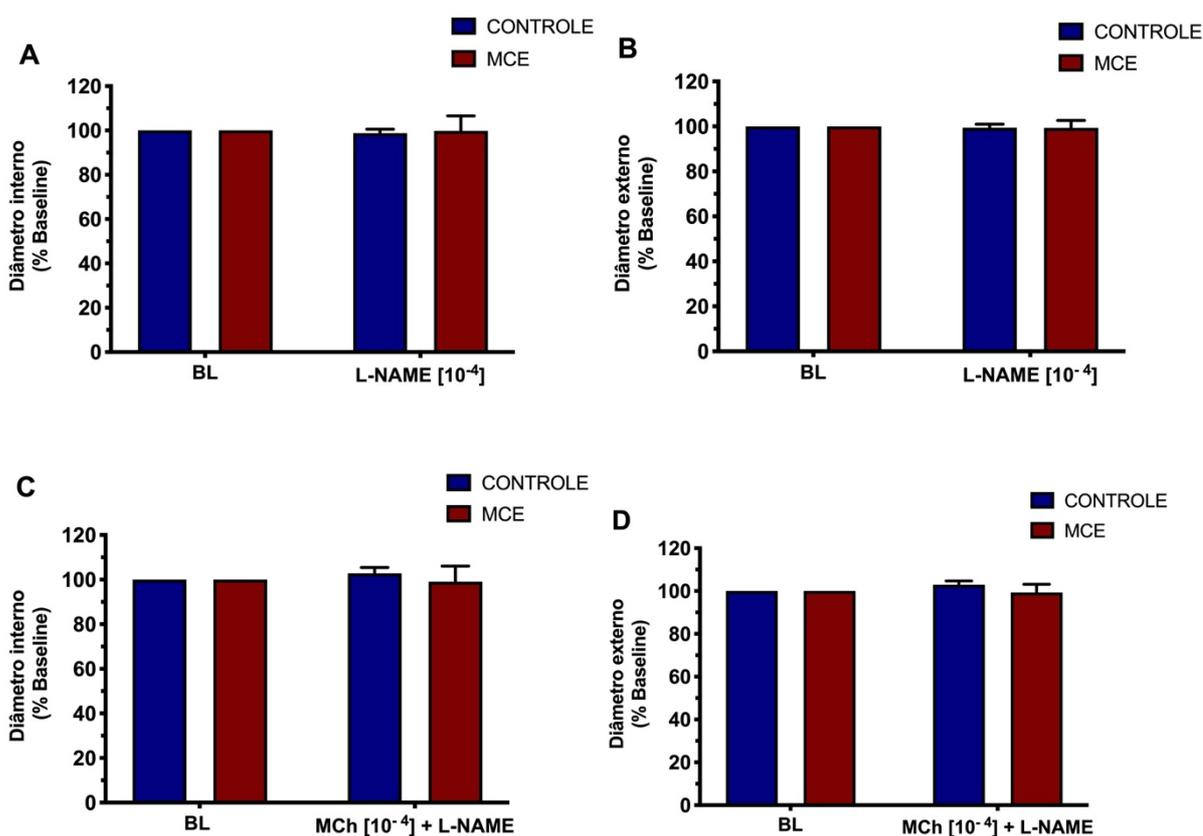


Figura 30 - Vasorreatividade *ex vivo* em MCAs de camundongos com MCE frente a estímulos dependentes e independentes de endotélio.

Avaliação da resposta vascular da artéria cerebral média de animais controles não infectados e de animais com MCE antes e após estímulo com metacolina, nitroprussiato de sódio e serotonina. A resposta vascular foi mensurada em 4 MCAs de animais controles não infectados e 7 MCAs oriundas de animais com MCE (uma MCA coletada por animal - diâmetros interno e externo). Teste *Two-way* ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados. **A e B** - Artérias cerebrais de animais controles não infectados e animais com MCE apresentaram potente resposta vasodilatadora ao estímulo com metacolina. Não houve diferença na resposta entre controles e MCE. **C e D** - A superfusão das MCAs com nitroprussiato de sódio induziu vasodilatação nas artérias de ambos os grupos experimentais, controle e MCE. De modo geral, não houve diferença na resposta entre controles e MCE. Entretanto, quando a resposta nas doses mais altas (10⁻⁴ e 10⁻⁵M) foi analisada isoladamente, a resposta vasodilatadora (diâmetro interno) foi mais intensa nos animais MCE do que nos controles (P=0.0276 e 0.0409, respectivamente). **E e F** - A resposta vasoconstritora ao estímulo com serotonina não foi diferente entre animais controles não infectados e animais com MCE. MCE, malária cerebral experimental; BL, *baseline*; MCh, metacolina; SNP, nitroprussiato de sódio; 5-HT, serotonina.

Os diâmetros (internos e externos) das MCAs de animais controles não infectados ou animais com MCE não tiveram alteração após estímulo com L-NAME, um inibidor da NOS (Figura 31 A e B). Entretanto, o L-NAME foi capaz de inibir a resposta dilatadora dos vasos frente ao estímulo com metacolina, em ambos os grupos (Figura 31 C e D). Esses dados sugerem que, de fato, a vasodilatação promovida pela metacolina nos experimentos anteriores foi mediada pela produção de NO.

Ao contrário do observado com a metacolina, o L-NAME não foi capaz de inibir a vasodilatação das MCAs promovida pelo nitroprussiato de sódio (Figura 31 E e F), nem a resposta vasoconstritora promovida pela serotonina (Figura 31 G e H). Esses dados mostram que o sistema funcionou muito bem, uma vez que, de fato, as respostas ao nitroprussiato de sódio e à serotonina são independentes de NOS.



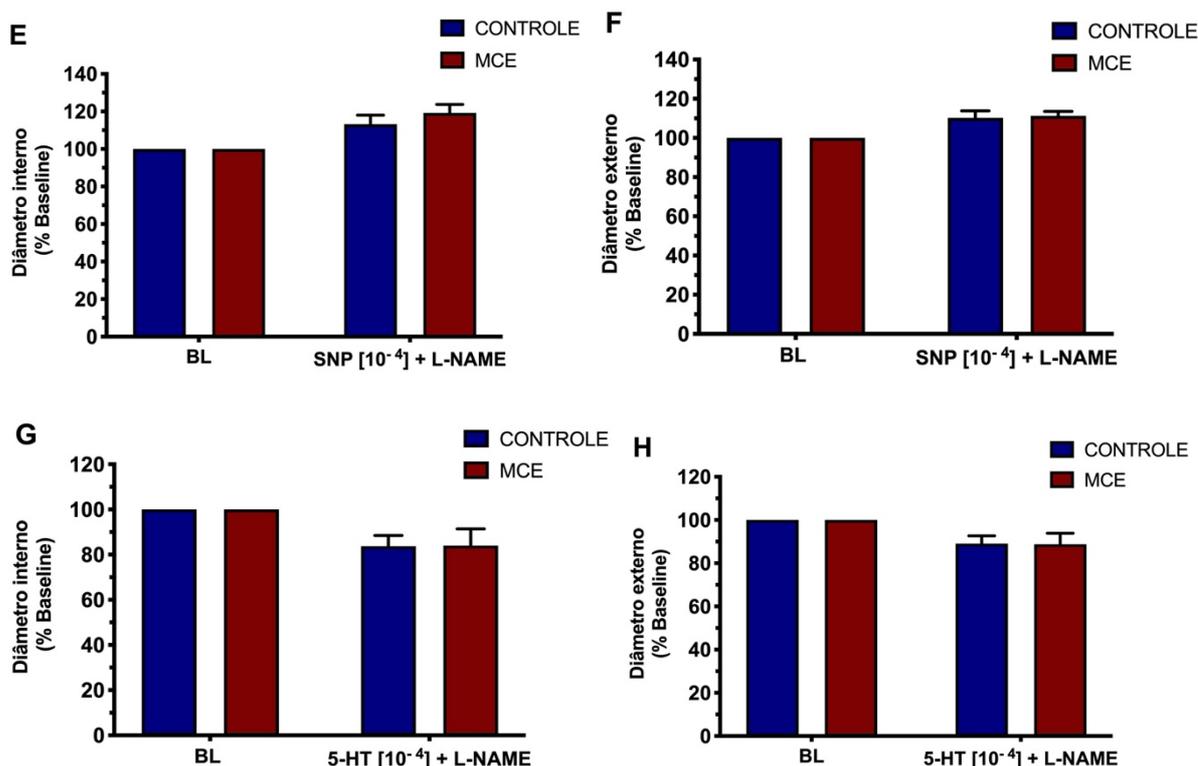


Figura 31 - Vasorreatividade *ex vivo* em MCAs de camundongos com MCE frente a estímulos dependentes e independentes de endotélio na presença de L-NAME.

Avaliação da resposta vascular da artéria cerebral média de animais controles não infectados e animais com MCE antes e após estímulo com metacolina, nitroprussiato de sódio e serotonina na presença do inibidor da NOS, L-NAME. A resposta vascular foi mensurada em 4 MCAs de animais controles não infectados e 7 MCAs oriundas de animais com MCE (uma MCA coletada por animal – diâmetros interno e externo). O teste *t-Student* foi utilizado para verificar as diferenças de resposta aos estímulos entre os grupos controle e MCE. **A e B** - L-NAME não alterou a resposta vascular quando administrado sozinho. **C e D** - L-NAME inibiu a vasodilatação promovida pela metacolina de maneira similar nas artérias de animais controles e animais com MCE. **E e F** - L-NAME não inibiu a resposta vasodilatadora induzida por nitroprussiato de sódio nas MCAs de ambos os grupos experimentais, controle e MCE. Assim como observado quando o SNP foi utilizado de maneira isolada na concentração de 10⁻⁴M (Figura 30), as MCAs (diâmetro interno) de animais MCE responderam de maneira mais intensa ao SNP + L-NAME do que as MCAs de animais controles não infectados ($P=0.0147$). **G e H** - Artérias cerebrais estimuladas com L-NAME continuaram a apresentar resposta vasoconstritora ao estímulo com 5-HT. MCE, malária cerebral experimental; BL, *baseline*; MCh, metacolina; SNP, nitroprussiato de sódio; 5-HT, serotonina; L-NAME, *N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride*.

4.7 Avaliação *ex vivo* da produção de NO em artérias cerebrais na MCE

Além das respostas funcionais das MCAs (dilatação/constricção frente a estímulos), verificamos a produção de NO pelas artérias cerebrais (MCAs, ACAs e PCAs) oriundas de animais controles não infectados e animais com MCE, submetidas a diferentes estímulos. Inicialmente, verificamos a produção de NO das artérias incubadas em tampão KH, o mesmo usado nos experimentos de miografia relatados acima, e a mensuração do NO foi avaliada por ensaio DAF-2 (uma sonda molecular que se liga especificamente ao NO e, ao fazê-lo, emite fluorescência em 538 nm).

Artérias cerebrais de animais controles não infectados e de animais com MCE estimuladas com metacolina apresentaram aumento da produção de NO (Figura 32). Esse aumento de NO induzido pela metacolina foi bloqueado com a adição de L-NAME, mostrando que, de fato, a produção de NO é mediada pela NOS. O L-NAME sozinho diminuiu a produção de NO. Esses resultados mostraram que a produção de NO estimulada pela metacolina em artérias de animais com MCE é comparável a produção de NO por artérias de animais controles, o que corrobora os achados do experimento *ex vivo* de reatividade vascular.

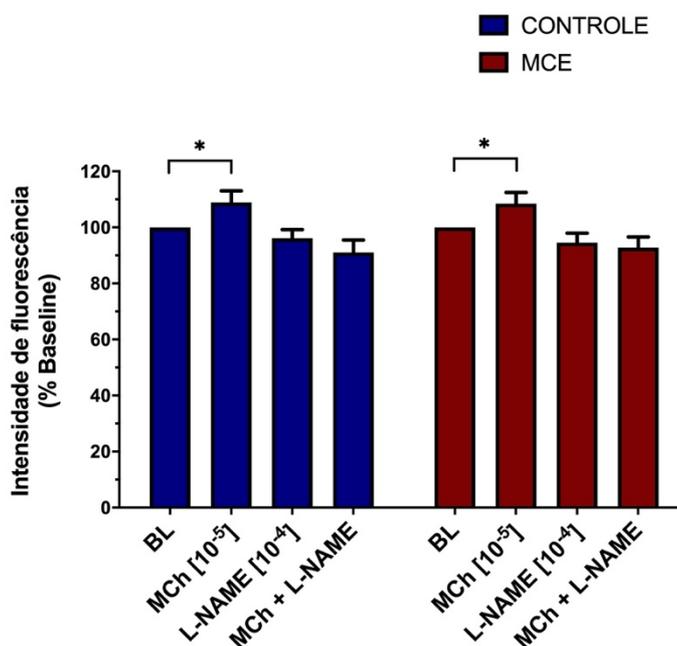


Figura 32 - Produção de óxido nítrico por artérias cerebrais isoladas de animais com MCE incubadas em tampão KH e submetidas a diferentes estímulos.

Avaliação da produção de NO por artérias cerebrais (MCAs, ACAs e PCAs) isoladas de animais controles não infectados e animais com MCE incubadas em tampão KH e estimuladas com metacolina na presença ou não de L-NAME. Teste *Two-way ANOVA* foi utilizado para a análise estatística dos dados. O estímulo com metacolina promoveu aumento na produção de NO tanto por artérias cerebrais de animais controles (n=6) quanto por artérias de animais com MCE (n=6) (P=0.002). A adição de L-NAME reverteu a produção de NO induzida por metacolina nos dois grupos. MCE, malária cerebral experimental; BL, *baseline*; MCh, metacolina; L-NAME, *N^ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride*.

Esses dados sugerem que a disfunção vascular observada na MCE não é inerente ao vaso, e aventamos assim a hipótese de que existiria no plasma de animais com MCE algum fator levando a, ou contribuindo para, essa disfunção. Assim, esse experimento de mensuração da produção de NO foi repetido, dessa vez adicionando-se plasma de animais controles ou de animais com MCE ao sistema. Como pode ser observado na figura 33, a produção basal de NO em artérias cerebrais de animais com MCE foi aparentemente menor que nas artérias de animais controles não infectados, mas com a variação observada não houve diferença significativa. Nessa

mesma condição, em vasos incubados com plasma de animais controles, a adição de metacolina estimulou a produção de NO tanto pelos vasos de animais controles quanto pelos vasos de animais com MCE, ou seja, similar ao que foi observado no sistema sem a presença de plasma. Mas, de maneira surpreendente, o plasma de animais com MCE por si só induziu a produção de NO pelas artérias de ambos os grupos experimentais, controle e MCE. Ou seja, ao contrário de nossa expectativa de que o plasma de animais com MCE contivesse algum fator inibidor da produção de NO, ou neutralizante do mesmo, nossos dados indicam que o plasma desses animais contém um fator, ou fatores, indutores da produção de NO.

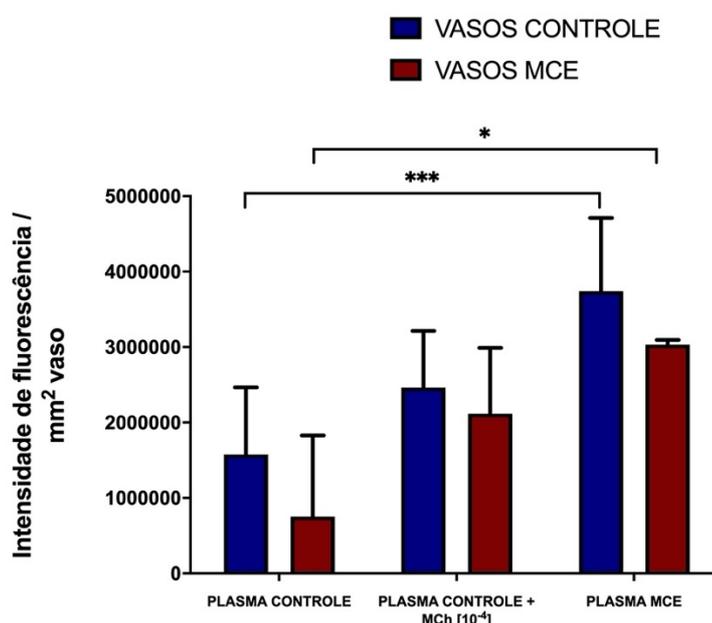


Figura 33 - Produção de óxido nítrico por artérias cerebrais isoladas de animais com MCE incubadas em plasma de animais controles ou de animais com MCE.

Avaliação da produção de NO por artérias cerebrais (MCAs, ACAs e PCAs) isoladas de animais controles não infectados e de animais com MCE. Foi avaliada a produção de NO nos vasos incubados com: **a)** Plasma de animais controles não infectados; **b)** Plasma de animais controles não infectados + metacolina; **c)** Plasma de animais com MCE. Teste *Two-way* ANOVA foi utilizado para a análise estatística dos dados. A adição de metacolina ao plasma de animais controles não infectados não aumentou de forma significativa a produção de NO nos vasos de animais controles (n=6) ou nos vasos de animais MCE (n=2) (apesar de haver um aumento visual). Já o plasma de animais com MCE induziu um forte aumento na produção de NO tanto nos vasos de animais controles não infectados (P=0.0002) quanto de animais com MCE (P=0.041). MCE, malária cerebral experimental; MCh, metacolina.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que animais que desenvolveram MCE apresentaram diminuição significativa no fluxo sanguíneo cerebral quando comparados a animais controles não infectados. Esse achado corrobora estudo anterior do próprio grupo (Moreira AS, dissertação de mestrado) que, utilizando também a técnica de LSCI, mostrou que animais infectados por PbA, no momento em que manifestam a MCE (sexto dia após a infecção), apresentaram uma redução substancial (aproximadamente 27%) no fluxo sanguíneo cerebral quando comparados a animais não infectados. A isquemia parece também desempenhar importante papel na MC induzida por PbA em camundongos da linhagem CBA. Sanni et al. (2001), utilizando imageamento por ressonância magnética (MRI), demonstraram que a redução no fluxo sanguíneo cerebral levou a hipóxia em animais com MC e que essa hipóxia estava diretamente relacionada a níveis aumentados de alanina e lactato no cérebro dos animais no momento da manifestação da síndrome neurológica. Redução na perfusão cerebral foi também observada por Penet et al. (2005) com o uso de MRI e associada diretamente à causa da morte em animais com MCE. Os autores sugerem que o edema cerebral que ocorre nessa síndrome neurológica seria responsável pela compressão das artérias cerebrais e consequente queda no fluxo sanguíneo. Remer et al. (2019) avaliaram a microcirculação da retina (que é embriologicamente derivada do sistema nervoso central (SNC), possui estruturas análogas as do cérebro e, portanto, é capaz de espelhar as características histológicas da MC no cérebro) utilizando a técnica de imageamento por *laser speckle* acoplado a câmera de celular. Os autores também verificaram diminuição no fluxo sanguíneo de animais com MCE quando comparados a animais não infectados ou infectados por PbNK65, uma linhagem que induz malária não cerebral. Redução no fluxo sanguíneo também foi observada por microscopia intravital da microcirculação cerebral de animais que desenvolveram MCE. Os autores associaram essa redução do fluxo sanguíneo ao processo de vasoconstrição, adesão de leucócitos ao endotélio vascular cerebral e a redução da velocidade das células sanguíneas (CABRALES et al., 2010). Em humanos, perfusão prejudicada foi observada por angiografia da retina em crianças com MC, e os autores relacionaram o prejuízo na perfusão ao sequestro de eritrócitos parasitados (BEARE et al., 2009). Além disso, assim como no modelo animal (PENET et al. 2005), a diminuição no fluxo sanguíneo cerebral foi associada ao aumento da mortalidade em humanos (O'BRIEN et al., 2018). Todos esses

achados comprovam o papel fundamental da isquemia na patogênese e letalidade da malária cerebral. Portanto, intervenções terapêuticas que melhorem a perfusão podem ser benéficas nessa síndrome neurológica.

A disfunção vascular exerce importante papel na MC, levando a vasoconstrição com conseqüente queda no fluxo sanguíneo cerebral, hipóxia e finalmente a morte nessa síndrome neurológica. Já se sabe que, tanto na MC humana quanto na experimental, essa disfunção é caracterizada pela baixa biodisponibilidade de NO, principal regulador fisiológico de tônus vascular (ANSTEY et al., 1996, GRAMAGLIA et al., 2006). Baixos níveis dessa molécula foram associados a diminuída função microvascular e endotelial em crianças com malária grave e moderadamente grave (YEO et al., 2014) e a produção de NO foi inversamente correlacionada a gravidade da doença (ANSTEY et al., 1996). Disfunção vascular cerebral relacionada a produção deficiente de NO também tem sido observada na MCE (ONG et al., 2013). Nosso grupo já demonstrou que a superfusão direta de L-arginina, precursor da síntese de NO pela NOS, nos vasos da pia-máter de animais com MCE induziu imediata dilatação nesses animais. Além disso, administração sistêmica de L-arginina, combinada ou não com artesunato, preveniu o agravo da constrição cerebrovascular (ONG et al., 2018). Recentemente, mostramos através da técnica de *laser speckle* que L-arginina administrada sozinha aumentou o fluxo sanguíneo cerebral em animais com MCE 1 hora após o tratamento (Moreira AS, dissertação de mestrado). No presente estudo, nos perguntamos, então, se a L-arginina administrada com artesunato continuaria tendo um efeito benéfico sobre o fluxo sanguíneo cerebral e se este efeito seria duradouro (3 e 6 horas após o tratamento). Corroboramos e expandimos nossos achados prévios ao demonstrar que, quando usada em combinação com artesunato como terapia adjuvante para a MCE, L-arginina novamente induziu aumento no fluxo sanguíneo cerebral a curto prazo (1 hora) em animais doentes, inclusive, restaurando a perfusão cerebral a níveis não diferentes de animais controles não infectados. Entretanto, o aumento no fluxo retrocedeu 3 e 6 horas após o tratamento. Embora transiente, essa reversão inicial da isquemia cerebral pode ajudar o animal muito doente com MCE em estágio tardio a preservar a função cerebral melhor do que animais recebendo apenas artesunato. De fato, o aumento no fluxo sanguíneo cerebral inicial foi associado a aumentada sobrevivência desses animais tratados com artesunato mais L-arginina. Os benefícios da intervenção com L-arginina têm sido demonstrados também em humanos. Estudos iniciais abordando o tratamento de adultos com malária grave e moderadamente grave através da infusão de L-arginina

mostraram uma melhora na biodisponibilidade de NO e na função endotelial nos pacientes (YEO et al., 2007, YEO et al., 2008b). Em um estudo mais recente envolvendo pacientes com malária grave, não foi observado um efeito significativo de L-arginina administrada em infusão lenta (1,5 g/hora em 8 horas), seja na eliminação ("clearance") de lactato ou na produção de NO (YEO et al., 2013). Essa ausência de efeito foi atribuída à dose baixa de L-arginina. Mas uma outra questão é que a L-arginina utilizada nos estudos em humanos é a formulação com hidróclorato (HCl), que pode levar a quedas no íon bicarbonato e no pH sanguíneo, resultando em interferência negativa nos parâmetros avaliados. No nosso estudo, a L-arginina utilizada é pura e, portanto, não possui esse efeito negativo.

Já se sabe que a disfunção vascular também leva a quebra da barreira hematoencefálica na MCE (THUMWOOD et al., 1988). O aumento da permeabilidade vascular no cérebro é considerado um dos principais fatores na patogênese da MC humana e experimental, pois permite não apenas o extravasamento de moléculas potencialmente tóxicas para o sistema nervoso central como também acaba resultando em acúmulo de líquido e edema no cérebro. Como o tratamento com L-arginina aumentou o fluxo sanguíneo cerebral e a sobrevivência dos animais doentes, nos perguntamos se a L-arginina teria outros benefícios sobre o endotélio, por exemplo, regenerando a coesão das células e assim diminuindo a permeabilidade vascular. Ao contrário do que esperávamos, o tratamento de animais com MCE com artesunato associado a L-arginina não foi capaz de reverter a quebra da barreira hematoencefálica nesses animais nos esquemas de tratamentos e doses testadas, mesmo 6 horas após a intervenção. Isso indica que, mesmo recuperando parcialmente a função, o sistema vascular no cérebro permanece ainda danificado, com a função endotelial prejudicada. O fato de que mesmo uma recuperação parcial da função leva a uma melhora da sobrevivência indica que intervenções mais eficazes tendo como alvo a vasculatura cerebral podem ter impacto ainda maior na recuperação dos animais.

A regulação do fluxo sanguíneo cerebral é altamente complexa e numerosos mecanismos atuam em conjunto afetando o tônus vascular (ATTWELL et al., 2010). A ação do NO na regulação do fluxo sanguíneo cerebral é complementada, modificada e/ou influenciada por mecanismos e mediadores diversos e, nesse sistema complexo, as vias relacionadas a metabólitos vasoativos do ácido araquidônico, produzidos e atuantes nos elementos componentes da unidade neurovascular (neurônios,

astrócitos, células do músculo liso vascular, células endoteliais, pericitos), tem papel altamente relevante.

O ácido araquidônico (AA) é capaz de gerar metabólitos tanto vasodilatadores quanto vasoconstritores dependendo do estímulo recebido principalmente pelos astrócitos. Como a MC cursa com vasoconstrição que leva a isquemia, nossa hipótese foi a de que durante essa síndrome neurológica ocorre uma produção aumentada de metabólitos vasoconstritores da via do AA em detrimento da produção dos metabólitos vasodilatadores e, conseqüentemente, queda no fluxo sanguíneo cerebral nos animais afetados. Alguns trabalhos mostraram, por exemplo, que os leucotrienos, metabólitos vasoconstritores da via do AA, foram deletérios, enquanto as prostaglandinas, metabólitos vasodilatadores, tiveram um papel benéfico na MCE (XIAO et al., 1999, BALL et al., 2004). Nosso grupo demonstrou anteriormente que o tratamento de animais que desenvolveram MCE com ozagrel, um inibidor da produção do eicosanoide vasoconstritor TXA₂, aumentou significativamente o fluxo sanguíneo cerebral nesses animais 1 hora após a intervenção. Esse achado nos mostrou que, de fato, poderia haver uma desregulação no eixo da via do AA responsável pela geração de TXA₂ levando a uma produção exacerbada deste metabólito constritor no cérebro que parece agravar o quadro de isquemia na MCE, visto que inibir a produção de TXA₂ reverteu o processo isquêmico gerado pela doença (Moreira AS, dissertação de mestrado). No presente estudo, nós vimos que animais com MCE apresentaram níveis variáveis de TXA₂ no cérebro, em alguns casos níveis muito altos, mas no geral, não foram observadas diferenças significativas quando comparados aos níveis desse eicosanoide no cérebro de animais controles não infectados ou infectados por PbNK65. No entanto, a administração sistêmica de ozagrel, causou uma marcante diminuição nos níveis de TXA₂ no cérebro de animais com MCE. Nossos dados sugerem que o bloqueio mesmo da geração basal de TXA₂ no cérebro pode ser benéfico por reverter a vasoconstrição e restaurar o fluxo sanguíneo em animais com MCE. Além disso, ozagrel pode estar melhorando o fluxo sanguíneo por efeitos além da inibição da produção do vasoconstritor TXA₂. Koumura et al. (2011) relatam que um dos efeitos do ozagrel é, secundariamente, aumentar os níveis de prostaciclina, potente eicosanoide vasodilatador. É importante destacar também que, ao inibir a atividade de tromboxano sintase, ozagrel pode ativar a fosforilação de eNOS, aumentando dessa forma a produção de NO, o que poderia levar ao aumento do fluxo sanguíneo cerebral nos animais tratados com essa droga (KOU MURA et al., 2011). Por outro lado, é possível ainda que o ozagrel possa apresentar efeitos fora do alvo e

induzir o aumento do fluxo sanguíneo cerebral por outros mecanismos que não a inibição da enzima tromboxano sintase.

Assim como no caso da L-arginina, o efeito benéfico de ozagrel sobre a microcirculação cerebral foi associado a um aumento na sobrevivência dos animais com MCE, sugerindo assim um papel potencial de ozagrel como terapia adjuvante ao artesunato nessa síndrome neurológica. E também como no caso da L-arginina, o tratamento dos animais com artesunato mais ozagrel não foi capaz de reverter a quebra da barreira hematoencefálica presente em animais com MCE.

Uma vez que a inibição da enzima tromboxano sintase diminuiu os níveis cerebrais de TXA₂ levando a aumento do fluxo sanguíneo cerebral (Moreira AS, dissertação de mestrado), resolvemos avaliar como a doença afetaria os níveis de outros metabólitos vasoativos relevantes da via do AA e se intervenções destinadas a inibir a produção de eicosanoides vasoconstritores, quando administradas sistemicamente, seriam capazes de diminuir a produção desses eicosanoides no tecido cerebral.

Observamos que tanto animais que desenvolveram MCE quanto aqueles com MNC apresentaram níveis aumentados de 8-isoprostanos no cérebro quando comparados a animais controles não infectados. Já se sabe que 8-isoprostanos são gerados por oxidação não enzimática do AA (MORROW, 2006), portanto a infecção malárica por si induziu significativo estresse oxidativo. De fato, na malária grave humana observa-se níveis plasmáticos elevados de F2-isoprostanos (PLEWES et al., 2017). Além de serem biomarcadores de estresse oxidativo, 8-isoprostanos são potentes vasoconstritores (TAKAHASHI et al., 1992, HOFFMAN; MOORE; ELLIS, 1997, JANSSEN et al., 2001) e essa vasoconstrição parece ser mediada, na realidade, pela aumentada liberação de TXA₂ principalmente oriundo de astrócitos e células endoteliais. HOU et al. (2000) mostraram que a constrição de microvasos periventriculares induzida por 8-isoprostanos foi quase completamente suprimida pela inibição da síntese de TXA₂ (através da inibição de tromboxano sintase por CGS 12970), bem como pelo bloqueio dos receptores de tromboxano. Esses dados são consistentes com o achado desse estudo, uma vez que o tratamento de animais que desenvolveram MCE com ozagrel, inibidor da produção de TXA₂ por tromboxano sintase, diminuiu os níveis de 8-isoprostanos no cérebro desses animais. O mecanismo pelo qual ozagrel causa diminuição nos níveis de 8-isoprostanos na MCE, no entanto, não é claro. De qualquer maneira, esses dados indicam que o aumento do fluxo sanguíneo cerebral induzido pelo tratamento com ozagrel na MCE poderia se

dar tanto pela inibição direta da produção de TXA₂ quanto indiretamente por suprimir 8-isoprostanos, ambos agentes vasoconstritores. O aumento de fluxo sanguíneo, por sua vez, melhoraria a oxigenação tecidual, limparia os resíduos metabólicos contribuindo para diminuição do estresse oxidativo e formação de 8-isoprostanos no cérebro.

Uma vez que tanto animais com MCE quanto aqueles que desenvolveram MNC apresentaram aumento nos níveis de 8-isoprostanos, parece que esse mediador não pode por si só estar associado a patogênese da MCE. Contudo, os níveis cerebrais de derivados do ácido araquidônico gerados enzimaticamente indicam que na MCE ocorre, de fato, um desbalanço que leva a maior produção de eicosanoides vasoconstritores (20-HETE e 14,15-DHET), em detrimento da produção de eicosanoides vasodilatadores (PGE₂ e 14,15-EET).

Nosso trabalho mostrou que as concentrações de PGE₂, importante eicosanoide vasodilatador, estavam aumentadas no tecido cerebral de animais com MNC e não estavam alteradas em animais com MCE e em animais controles não infectados. De fato, um estudo de Xiao et al. (1999) sugere que as prostaglandinas são protetoras na MCE, uma vez que o tratamento com aspirina, um inibidor da síntese de prostaglandina, agravou o quadro dos animais com MCE. Achado semelhante foi encontrado por Ball et al. (2004), que mostraram que o tratamento de animais com MCE com celecoxib, inibidor de COX2, agravou o quadro da doença, reforçando novamente o efeito benéfico da prostaglandina na MCE. Além disso, os níveis de PGE₂ foram inversamente correlacionados com a gravidade da doença em crianças africanas (PERKINS; KREMSNER; WEINBERG, 2001). Dessa forma, o aumento nos níveis de PGE₂ em animais com MNC, mas não em animais com MCE, sugere um efeito protetor, ajudando a prevenir a isquemia nos animais infectados com PbNK65.

Uma vez que tanto tromboxano sintase quanto prostaglandina sintase utilizam o mesmo substrato, PGH₂, para a produção de TXA₂ e PGE₂, respectivamente, nos perguntamos se o tratamento com ozagrel (inibidor de tromboxano sintase) poderia levar ao aumento dos níveis de PGE₂ no cérebro de animais com MCE, já que PGH₂ estaria mais disponível para utilização pela prostaglandina sintase. No entanto, ozagrel não levou a um aumento da produção de PGE₂ nos animais tratados.

Alguns trabalhos têm mostrado a contribuição de 20-HETE para a isquemia cerebral (DUNN et al., 2008, FORDSMANN et al., 2013). No presente estudo, nós vimos que as concentrações de 20-HETE aumentaram na MCE quando comparadas às concentrações em animais controles e àqueles com MNC. 20-HETE é um potente

eicosanoide vasoconstritor e níveis aumentados desse metabólito no tecido cerebral podem agravar o processo isquêmico característico da MCE. O aumento na produção de 20-HETE pode se dar pela conversão aumentada do AA a 20-HETE no músculo liso vascular e/ou pelos baixos níveis de NO. Em condições fisiológicas, NO é um importante inibidor da produção de 20-HETE (ATTWELL et al., 2010). Como a MCE cursa com baixa biodisponibilidade de NO, os níveis desse mediador não seriam mais capazes de inibir a produção de 20-HETE que, por sua vez, promoveria vasoconstrição. O tratamento dos animais que desenvolveram MCE com HET0016, um inibidor seletivo das isoformas da enzima CYP4A, diminuiu a produção de 20-HETE no cérebro desses animais. Esse dado é importante, pois confirma que a droga chegou ao sítio-alvo, o cérebro, e inibiu, de fato, a enzima CYP4A. O tratamento com HET0016 tem apresentado diversos benefícios em doenças cerebrais. A droga tem se mostrado eficaz em reduzir a área de infarto, a produção de espécies reativas de oxigênio pela vasculatura cerebral (DUNN et al., 2008, LIU et al., 2014) e o edema cerebral (LIU et al., 2014, SHAIK et al., 2015). Além disso, a inibição de 20-HETE por HET0016 foi capaz de prevenir a quebra da barreira hematoencefálica (LIU et al., 2014) e melhorar o fluxo sanguíneo cerebral (SHAIK et al., 2015). Saber de que maneira a diminuição nas concentrações do eicosanoide vasoconstritor 20-HETE poderia ser benéfica na MCE (talvez melhorando o fluxo sanguíneo cerebral, revertendo a vasoconstrição ou a quebra da barreira hematoencefálica, etc.) ainda precisa ser investigada.

As concentrações de 14,15-EET foram menores no cérebro de animais com MCE quando comparadas com as concentrações em animais não infectados. Os EETs são metabólitos vasodilatadores da via do AA que desempenham importante papel na regulação do fluxo sanguíneo cerebral em condições fisiológicas (IMIG, 2016, DAVIS; LIU; ALKAYED, 2017). Os EETs são metabolizados pela epóxido hidrolase solúvel (sEH) em seu diol menos ativo, os ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs). A diminuição nos níveis cerebrais do vasodilatador 14,15-EET em animais com MCE dá suporte à nossa hipótese original de que ocorreria uma desregulação na homeostase do AA com predomínio da produção de eicosanoides constritores sobre os vasodilatadores, contribuindo para a vasoconstrição e isquemia na MCE. Alguns trabalhos têm destacado o papel protetor dos EETs em doenças isquêmicas. A administração exógena de 14,15-EET (LIU et al., 2015), bem como a inibição da sEH, foram benéficas nesses casos (DORRANCE et al., 2005, LIU et al., 2015). No nosso trabalho, as concentrações de 14,15-EET após tratamento de animais com MCE

utilizando AUDA (inibidor da enzima sEH) não foram diferentes das concentrações em animais que receberam o veículo. Esperávamos que a inibição da sEH impedisse a conversão de 14,15-EET no seu metabólito menos ativo, 14-15-DHET, aumentando suas concentrações cerebrais e, conseqüentemente, potencializando o efeito vasodilatador de 14,15-EET. É preciso enfatizar, no entanto, que apenas uma dose e um esquema de administração da droga foram utilizados e, portanto, é possível que combinações diferentes possam ter efeitos diferentes.

Mostramos também que os níveis de 14,15-EETs foram menores em animais com MNC quando comparados ao grupo controle e ao grupo MCE, mas esse achado precisa ser confirmado. Isso porque, em todos os ensaios que realizamos, o tempo entre o processamento das amostras de cérebro e a quantificação dos eicosanoides pelos ELISAs não passou de duas semanas. No entanto, nesse ensaio, as amostras utilizadas para determinação dos níveis de 14,15-EET em animais com MNC estavam estocadas há mais de 4 meses em congelador quando foram utilizadas e isso pode ter influenciado no resultado encontrado para este grupo especificamente. Assim, novas amostras deverão ser utilizadas para quantificação de 14,15-EET em cérebro de animais com MNC.

De forma interessante, observamos nesse trabalho que os níveis de 14,15-DHET, diol menos ativo oriundo do metabolismo de 14,15-EET, estavam aumentados no cérebro de animais com MCE quando comparados a animais com MNC. Isso sugere que animais com MCE possuem uma atividade aumentada da enzima sEH, levando a concentrações cerebrais aumentadas de 14,15-DHET, fruto do rápido metabolismo de 14,15-EET. Essa rápida conversão de 14,15-EET em 14,15-DHET preveniria a ação vasodilatadora desse EET, o que poderia contribuir para o processo isquêmico observado na MCE. De fato, um estudo mostrou que pacientes com comprometimento cognitivo vascular apresentaram expressão aumentada de sEH e níveis aumentados de 14,15-DHET na microcirculação cerebral (NELSON et al., 2014), e que a inibição de sEH utilizando AUDA-BE protegeu contra a injúria isquêmica cerebral, provavelmente por aumentar a biodisponibilidade de EET por prevenir seu metabolismo pela sEH (ZHANG et al., 2007).

Animais com MCE foram tratados com AUDA para determinação das concentrações de 14,15-DHET no tecido cerebral. Esperávamos que a inibição da sEH diminuísse os níveis desse metabólito no cérebro de animais doentes. Como descrito nos resultados, não pudemos determinar os efeitos do tratamento nesse experimento, pois os valores de absorbância no ELISA ficaram fora dos limites da

curva padrão nesse ensaio em particular. De qualquer forma, como não observamos efeito nos níveis de 14,15-EET após tratamento com AUDA, é provável que não veríamos efeito nos níveis de 14,15-DHET já que a mesma dose da droga foi utilizada para o tratamento desses animais e essa poderia não ser uma dose efetiva. Assim, avaliar outras doses e outros esquemas de administração em experimentos futuros nos ajudaria a esclarecer este ponto.

Conforme já dissemos e demonstramos aqui, a disfunção vascular que ocorre na MCE é caracterizada por vasoconstrição, redução no fluxo sanguíneo cerebral, ativação aumentada do endotélio vascular, quebra da barreira hematoencefálica e baixa biodisponibilidade de NO. Nossos dados indicam que a baixa biodisponibilidade de NO está relacionada a diminuição nos níveis do seu precursor, a L-arginina, já que o tratamento de animais com MCE utilizando esse aminoácido, substrato da NOS, aumentou o fluxo sanguíneo cerebral nesses animais, o que foi diretamente relacionado a melhora na sobrevivência. Além disso, nosso grupo já demonstrou que os vasos da microcirculação cerebral de animais com MCE não responderam a estímulos vasodilatadores pela superfusão com acetilcolina (que induz vasodilatação dependente de NOS endotelial) ou N-metil-D-aspartato (NMDA, que induz vasodilatação dependente de NOS neuronal) (ONG et al., 2013). Assim, parece que na MCE a baixa biodisponibilidade de NO não está apenas relacionada a diminuição nos níveis da L-arginina, mas também a uma disfunção das enzimas eNOS e nNOS. Os diminuídos níveis de NO e a prejudicada vasorregulação que ocorrem na MC tem sido observados *in vivo*, ou seja, na presença de fatores sistêmicos circulantes (no plasma) e no ambiente em torno (neurônios, astrócitos, micróglia e outros tipos celulares). Isolar o vaso e estudar sua resposta fora desse ambiente poderia nos ajudar a entender se a disfunção vascular observada na MCE seria intrínseca do vaso ou dependente de outros fatores presentes no plasma ou no próprio ambiente cerebral. Estudos de miografia foram realizados para investigar a resposta vascular das artérias isoladas de animais com MCE, com a hipótese inicial que a resposta vasodilatadora estaria prejudicada nessa síndrome neurológica. Surpreendentemente, nós vimos que artérias cerebrais isoladas de animais com MCE responderam a estímulos vasodilatadores dependentes (metacolina) e independentes (nitroprussiato de sódio) do endotélio. A resposta vasodilatadora a nitroprussiato de sódio foi, inclusive, mais intensa em animais doentes quando comparada a resposta de animais controles. Isso pode ser explicado pelo fato de que animais com MCE já apresentam uma constrição prévia vascular, assim, quando o estímulo com

nitroprussiato é fornecido, o vaso desses animais parte de um diâmetro basal inferior ao de um vaso de animal controle não infectado e a resposta vasodilatadora poderia ser maior, de fato. Além disso, as artérias foram responsivas ao estímulo vasoconstritor com serotonina. A administração de L-NAME (inibidor da NOS) inibiu o efeito vasodilatador de metacolina, mas não o efeito de nitroprussiato de sódio, sugerindo que a vasodilatação observada no caso da metacolina foi mediada pela produção de NO pela NOS. A vasoconstrição não foi inibida por L-NAME após estímulo com serotonina, como esperado, visto que a resposta à serotonina é independente de NOS. Importante, o efeito desses estímulos sobre os vasos de animais com MCE foi semelhante ao apresentado por vasos de animais controles não infectados. Esses achados mostraram que os vasos de animais com MCE estão tão responsivos aos estímulos quanto os vasos de animais controles não infectados e isso refuta a nossa hipótese inicial. A mensuração da produção de NO pelo ensaio DAF-2 confirmou que os vasos de animais com MCE foram capazes de liberar NO em resposta ao estímulo farmacológico com metacolina e essa liberação foi inibida após adição de L-NAME ao sistema, mostrando que a produção de NO foi mediada pela NOS, corroborando os achados do experimento *ex vivo* de reatividade vascular. Esses resultados sugeriram que a disfunção vascular que ocorre na MCE não é inerente do vaso, e indicando que seria resultante de fatores do ambiente (luminal e/ou abluminal). Dessa forma, uma das hipóteses que surgiram foi que existiria algum fator no plasma de animais com MCE levando a essa disfunção vascular. Artérias de animais com MCE e de animais controles quando incubadas em plasma de animais controles e estimuladas com metacolina continuaram a produzir NO, assim como foi observado quando as artérias foram incubadas em tampão. Mas, surpreendentemente, o plasma de animais com MCE por si só induziu a produção de NO pelas artérias cerebrais de animais com MCE e de animais controles. Ou seja, ao contrário de nossa expectativa de que o plasma de animais com MCE contivesse algum fator inibidor da produção de NO, ou neutralizante do mesmo, nossos dados indicam que o plasma desses animais contém um fator, ou fatores, indutores da produção de NO. Diante disso, a pergunta que surge é: que fator é esse presente no plasma de animais com MCE que está estimulando a produção de NO pelas artérias cerebrais? Estudos recentes *in vitro* demonstraram, por exemplo, que meio condicionado de *Plasmodium falciparum* continha cininas que atuam sobre os receptores B1 e B2 de bradicinina e levaram à perda de junção endotelial e aumento de permeabilidade em monocamadas de células endoteliais de cérebro humanas (SILVA et al., 2019). A bradicinina estimula a

produção de NO pelas células endoteliais (ANCION et al., 2019) e pode ser assim um candidato a ser pesquisado como fator indutor na produção de NO no plasma de animais com MCE. De fato, esses achados abrem uma nova perspectiva na busca desses fatores e sobre os mecanismos de disfunção vascular na malária cerebral. Além disso, esses resultados sugerem que o fator levando a constrição dos vasos piais na MCE, e que bloqueiam a resposta dos mesmos a estímulos dilatadores dependentes de NOS (CABRALES et al., 2010, ONG et al., 2013) talvez seja um fator tecidual e não plasmático, e isso aponta mais uma vez para a importância do papel dos metabólitos vasoativos da via do ácido araquidônico nesse cenário. Finalmente, é preciso salientar que os achados de resposta vascular à acetilcolina *in vivo* (ONG et al., 2013) e à metacolina *ex vivo* (presente estudo) podem não ser diretamente correspondentes. Isso porque os achados *in vivo* se referem à microcirculação cerebral, tendo as observações sido feitas em arteríolas piais com 20-70 μ m de diâmetro (externo). No presente estudo de miografia *ex vivo*, foi utilizada a MCA, uma artéria com diâmetro externo >120 μ m. Assim, é possível que esses dois tipos de vasos sejam afetados e respondam de maneira diferente a estímulos vasoativos na MCE. Experimentos futuros poderão responder a todas essas perguntas.

6 PERSPECTIVAS

Pretendemos publicar um artigo com os resultados obtidos nos experimentos *ex vivo* realizados no *Laboratory of Malaria and Vector Research* (LMVR-NIAID/NIH) durante o estágio de doutorado sanduíche;

Realizar experimentos utilizando outras doses e outras vias de administração de L-arginina para verificar se, dessa forma, quando combinada com artesunato, L-arginina seria capaz de induzir aumento no fluxo sanguíneo cerebral nos animais com MCE a longo prazo;

Utilizar outros esquemas de tratamentos e outras doses de ozagrel e L-arginina para verificar se, nessas novas condições, essas drogas seriam capazes de reverter a quebra da barreira hematoencefálica presente em animais com MCE;

Experimento interessante que poderia ser realizado futuramente seria a inibição da atividade da tromboxano sintase com ozagrel e determinação das concentrações do metabólito vasodilatador, prostaciclina, no tecido cerebral de animais com MCE antes e após intervenção. Isso porque talvez o aumento do fluxo sanguíneo cerebral que observamos em animais tratados com ozagrel seja causado por um aumento de prostaciclina (que pode, inclusive, estar diminuída na MCE) e não necessariamente pela diminuição basal das concentrações de TXA₂. Investigar, concomitantemente, o efeito da inibição farmacológica de prostaciclina e de TXA₂ (utilizando ozagrel) no fluxo sanguíneo cerebral também seria uma abordagem interessante;

O tratamento com ozagrel combinado com artesunato aumentou a sobrevida de animais com MCE, no entanto, como dissemos, esse resultado é oriundo de um único experimento. Novos experimentos de sobrevida com ozagrel devem ser conduzidos para confirmar esse achado. Além disso, é preciso demonstrar o efeito da intervenção com ozagrel em associação com a droga antimalárica sobre o fluxo sanguíneo cerebral a curto e longo prazo em animais com MCE e também o efeito de diferentes doses e vias de administração do fármaco;

Nossos resultados indicam que 20-HETE pode ter um papel importante na patogênese da MCE e a droga HET0016 pode ter potencial terapêutico na síndrome neurológica. No entanto, para confirmar isso, é preciso realizar experimentos adicionais. Investigar, por exemplo, os efeitos do tratamento com HET0016 sobre o fluxo sanguíneo cerebral, quebra da barreira hematoencefálica e sobrevida em animais com MCE auxiliaria na compreensão do papel de 20-HETE na patogenia

dessa síndrome neurológica. Visto que NO inibe a síntese de 20-HETE no músculo liso vascular cerebral, um experimento relevante seria investigar se o tratamento com L-arginina diminuiria os níveis de 20-HETE no cérebro de animais com MCE;

Diminuição nas concentrações cerebrais de 14,15-EET e aumento nas concentrações do seu diol menos ativo, 14,15-DHET, podem desempenhar papel importante na MCE e a inibição da degradação de 14,15-EET (metabólito vasodilatador) pela utilização de AUDA pode ser benéfica. Nos nossos experimentos não vimos um efeito de AUDA sobre os níveis de EETs e DHETs no tecido cerebral de animais com MCE, mas acreditamos que a dose utilizada da droga não tenha sido efetiva. Assim, novos experimentos utilizando outras doses e outros esquemas de administração da droga poderiam nos ajudar a esclarecer esse ponto futuramente;

Com relação aos experimentos *ex vivo*, é necessário repetir o ensaio DAF-2 para confirmar os resultados encontrados nos experimentos, principalmente os experimentos que avaliaram a produção de NO por vasos cerebrais de animais com MCE e de animais controles não infectados incubados em plasma;

Além disso, determinar qual é o fator (ou fatores) presente no plasma de animais com MCE que está estimulando a produção de NO tanto por artérias cerebrais de animais controles não infectados quanto por artérias de animais com MCE é de suma importância.

7 CONCLUSÕES

- Animais que desenvolveram malária cerebral experimental apresentaram diminuição significativa no fluxo sanguíneo cerebral no sexto dia após a infecção quando comparados a animais controles não infectados;

- Em combinação com artesunato, L-arginina induziu aumento no fluxo sanguíneo cerebral a curto prazo (1 hora) em animais com MCE. No entanto, o aumento no fluxo retrocedeu 3 e 6 horas após o tratamento;

- Animais tratados com L-arginina combinada com artesunato apresentaram sobrevida significativamente maior do que animais que receberam artesunato mais veículo;

- O tratamento dos animais com MCE com L-arginina combinada com artesunato não foi capaz de reverter a quebra da barreira hematoencefálica nesses animais;

- Animais que desenvolveram MCE não apresentaram aumento nas concentrações cerebrais de TXA₂ quando comparadas as concentrações em animais controles. No entanto, animais com MCE apresentaram marcante diminuição nos níveis cerebrais de TXA₂ após tratamento com ozagrel;

- O tratamento com ozagrel aumentou a sobrevida de animais com MCE;

- O tratamento dos animais com ozagrel combinado com artesunato não reverteu a quebra da barreira hematoencefálica presente em animais com MCE;

- Animais com MCE e aqueles que desenvolveram MNC apresentaram aumento nas concentrações cerebrais de 8-isoprostanos quando comparados aos controles não infectados. O tratamento com ozagrel diminuiu os níveis de 8-isoprostanos no cérebro de animais com MCE;

- As concentrações de PGE₂ estavam aumentadas no cérebro de animais com MNC quando comparadas às concentrações em animais controles não infectados e animais com MCE. O tratamento com ozagrel não aumentou a produção de PGE₂ em animais com MCE;

- As concentrações cerebrais de 20-HETE aumentaram na MCE quando comparadas às concentrações em animais controles e àqueles com MNC. O tratamento com HET0016 diminuiu a produção de 20-HETE no cérebro de animais que desenvolveram a MCE;

- As concentrações de 14,15-EET foram menores no cérebro de animais com MCE quando comparadas com as concentrações em animais controles não infectados. As concentrações cerebrais de 14,15-EET após tratamento de animais com MCE utilizando AUDA não foram diferentes das concentrações em animais que receberam somente o veículo;

- Animais com MCE apresentaram aumento significativo nas concentrações cerebrais de 14,15-DHET quando comparados a animais com MNC;

- Artérias cerebrais isoladas tanto de animais controles não infectados quanto de animais com MCE apresentaram respostas semelhantes a estímulos vasodilatadores dependentes (metacolina) e independentes (nitroprussiato de sódio) de endotélio e ao estímulo vasoconstritor com serotonina. A administração de L-NAME inibiu o efeito vasodilatador da metacolina, mas não o efeito do nitroprussiato de sódio ou o efeito constritor da serotonina tanto em vasos de animais com MCE quanto em vasos de animais controles não infectados;

- As artérias cerebrais tanto de animais controles não infectados quanto de animais com MCE foram capazes de liberar NO em resposta ao estímulo farmacológico com metacolina e essa liberação foi inibida após a administração de L-NAME;

- O plasma de animais com MCE por si só induziu a produção de NO tanto pelas artérias cerebrais de animais controles quanto de animais com MCE.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIKAWA, M. et al. *Plasmodium coatneyi*-infected Rhesus monkeys: a primate model for human cerebral malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 3, p. 443-447, 1992.

ALKAITIS, M.S. et al. Decreased rate of plasma arginine appearance in murine malaria may explain hypoargininemia in children with cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 12, p. 1840-1849, Dec.2016.

ANCION, A. et al. A review of the role of bradykinin and Nitric Oxide in the cardioprotective action of angiotensin-converting enzyme inhibitors: focus on perindopril. **Cardiology and Therapy**, v. 8, n. 2, p. 179-191, Oct.2019.

ANSTEY, N.M. et al. Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 2, p. 557-567, Aug.1996.

ANTINORI, S. et al. Biology of human malaria plasmodia including *Plasmodium knowlesi*. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**, v. 4, n. 1, p. e2012013, Mar.2012.

ATTWELL, D. et al. Glial and neuronal control of brain blood flow. **Nature**, v.468, p.232-243, Nov.2010.

AVRIL, M. et al. A restricted subset of var genes mediates adherence of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes to brain endothelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n. 26, E1782-90, Jun.2012.

AYATA, C. et al. Laser speckle flowmetry for the study of cerebrovascular physiology in normal and ischemic mouse cortex. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v.24, n.7, p.744-755, Jul.2004.

BALL, H.J. et al. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v.189, n.4, p.751-758, Feb.2004.

BARRERA, V. et al. Neurovascular sequestration in paediatric *P. falciparum* malaria is visible clinically in the retina. **eLIFE**, v. 7, e32208, Mar.2018.

BEARE, N.A. et al. Prognostic significance and course of retinopathy in children with severe malaria. **Archives of Ophthalmology**, v. 122, n. 8, p. 1141-1147, Aug.2004.

BEARE, N.A.V. et al. Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malaria retinopathy. **The Journal of Infectious Diseases**, v.199, n.2, p.263-271, Jan.2009.

BERTINARIA, M. et al. Amodiaquine analogues containing NO-donor substructures: synthesis and their preliminary evaluation as potential tools in the treatment of cerebral

malaria. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 5, p. 1757-1767, May.2011.

BERTINARIA, M. et al. NO-donor dihydroartemisinin derivatives as multitarget agents for the treatment of cerebral malaria. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, n. 19, p. 7895-7899, Sep.2015.

BIRBECK, G. L. et al. Blantyre Malaria Project Epilepsy Study (BMPES) of neurological outcomes in retinopathy-positive pediatric cerebral malaria survivors: a prospective cohort study. **The Lancet Neurology**, v. 9, n. 12, p. 1173-1181, Dec.2010.

BORGES, T.K.S. et al. Differences in the modulation of reactive species, lipid bodies, cyclooxygenase-2, 5-lipoxygenase and PPAR- γ in cerebral malaria-susceptible and resistant mice. **Immunobiology**, v. 222, n. 4, p. 604-619, Apr.2017.

BRASIL, P. et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. **The Lancet Global Health**, v. 5, n. 10, p. e1038-e1046, Oct.2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Malária. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/malaria>. Acesso em: 22 de outubro de 2019.

CABRALES, P. et al. Cerebral tissue oxygenation impairment during experimental cerebral malaria. **Virulence**, v. 4, n. 8, p. 686-697, Jul.2013.

CABRALES, P. et al. Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. **The American Journal of Pathology**, v.176, n.3, p.1306-1315, Mar.2010.

CABRALES, P. et al. Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 10, p. 1454-1463, May.2011.

CARVALHO, L.J.M. et al. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 5, p. 577-588, 2014.

COMIM, C.M. et al. Effects of experimental cerebral malaria in memory, brain-derived neurotrophic factor and acetylcholinesterase activity in the hippocampus of survivor mice. **Neuroscience Letters**, v.523, n.2, p.104-107, Jun.2012.

CONROY, A.L. et al. Angiopoietin-2 levels are associated with retinopathy and predict mortality in Malawian children with cerebral malaria: a retrospective case-control study. **Critical Care Medicine**, v. 40, n. 3, p. 952-959, Mar.2012.

COWMAN, A.F. et al. Malaria: Biology and Disease. **Cell**, v. 167, n. 3, p. 610–624, Oct.2016.

CRAIG, A.G. et al. The role of animal models for research on severe malaria. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p. e1002401, Feb.2012.

DAVIS, C.M.; LIU, X.; ALKAYED, N.J. Cytochrome P450 eicosanoids in cerebrovascular function and disease. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 179, p. 31-46, Nov.2017.

DEEGAN, A.J.; WANG, R.K. Microvascular imaging of the skin. **Physics in Medicine & Biology**, v. 64, n. 7, p. 1-48, Mar.2019.

DE NIZ, M.; HEUSSLER, V.T. Rodent malaria models: insights into human disease and parasite biology. **Current Opinion in Microbiology**, v. 46, p. 93-101, Oct.2018.

DE SOUZA, J.B. et al. Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. **Parasitology**, v. 137, n. 5, p. 755-772, Apr.2010.

DE SOUZA, J.B.; RILEY, E.M. Cerebral malaria: the contribution of studies in animal models to our understanding of immunopathogenesis. **Microbes and Infection**, v. 4, n. 3, p. 291-300, Mar.2002.

DESRUISSEAU, M.S. et al. Cerebral malaria: a vasculopathy. **The American Journal of Pathology**, v. 176, n. 3, p. 1075-1078, Mar.2010.

DONDORP, A.M. et al. Nitric oxides in plasma, urine, and cerebrospinal fluid in patients with severe falciparum malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 3, p. 497-502, Sep.1998.

DONDORP, A.M.; PONGPONRATN, E.; WHITE, N.J. Reduced microcirculatory flow in severe falciparum malaria: pathophysiology and electron-microscopic pathology. **Acta Tropica**, v. 89, n. 3, p. 309-317, Feb.2004.

DOROVINI-ZIS, K. et al. The neuropathology of fatal cerebral malaria in Malawian children. **The American Journal of Pathology**, v. 178, n. 5, p. 2146-2158, May.2011.

DORRANCE, A.M. et al. An epoxide hydrolase inhibitor, 12-(3-adamantan-1-yl-ureido) dodecanoic acid (AUDA), reduces ischemic cerebral infarct size in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 46, n. 6, p. 842-848, Dec.2005.

DUNN, A. Laser Speckle Contrast Imaging of cerebral blood flow. **Annals of Biomedical Engineering**, v.40, n.2, p.367-377, Feb.2012.

DUNN, K.M. et al. Elevated production of 20-HETE in the cerebral vasculature contributes to severity of ischemic stroke and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 295, n. 6, p. H2455-H2465, Dec.2008.

DUNST, J.; KAMENA, F.; MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, p. 1-16, Jul.2017.

EISENHUT, M. The evidence for a role of vasospasm in the pathogenesis of cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 14, n. 405, p. 1-9, Oct.2015.

ENGLISH, M. et al. Chronic salicylate poisoning and severe malaria. **The Lancet**, v.347, n.9017, 1736-1737, Jun.1996.

FILOSA, J.A.; IDDIGS, J.A. Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. **American Journal of Physiology**, v.305, n.5, p.609-619, Sep.2013.

FORDSMANN, J.C. et al. Increased 20-HETE synthesis explains reduced cerebral blood flow but not impaired neurovascular coupling after cortical spreading depression in rat cerebral cortex. **The Journal of Neuroscience**, v.33, n. 6, p.2562-2570, Feb.2013.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W.C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**, v.33, n.7, p.829-837, Apr.2012.

GAZZINELLI, R.T. et al. Innate sensing of malaria parasites. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 744-757, Oct.2014.

GHAZANFARI, N.; MUELLER, S.N.; HEATH, W.R. Cerebral malaria in mouse and man. **Frontiers in Immunology**, v. 9, Sep.2018.

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

GUPTA, S. et al. Extensive alterations of blood metabolites in pediatric cerebral malaria. **PloS ONE**, v. 12, n. 4, p. e0175686, Apr.2017.

HARA, K.; HARRIS, R.A. The anesthetic mechanism of urethane: the effects on neurotransmitter-gated ion channels. **Anesthesia and Analgesia**, v.94, n.2, p.313-318, Feb.2002.

HARDER, D.R. et al. Regulation of cerebral blood flow: response to cytochrome P450 lipid metabolites. **Comprehensive Physiology**, v. 8, n. 2, p. 801-821, Mar.2018.

HARIZI, H.; CORCUFF, J.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n. 10, p. 461-469, Oct.2008.

HIGGINGS, S.J. et al. Dysregulation of angiotensin-1 plays a mechanistic role in the pathogenesis of cerebral malaria. **Science Translational Medicine**, v. 8, n. 358, p.1-25, Sep.2016.

HOFFMAN, S.W.; MOORE, S.; ELLIS, E.F. Isoprostanes: free radical-generated prostaglandins with constrictor effects on cerebral arterioles. **Stroke**, v. 28, n. 4, p. 844-849, Apr.1997.

HOU, X. et al. Augmented vasoconstriction and thromboxane formation by 15-F (2t)-isoprostane (8-iso-prostaglandin F (2 alpha)) in immature pig periventricular brain microvessels. **Stroke**, v. 31, p. 516-524, Nov.2000.

IADECOLA, C. The neurovascular unit coming of age: A journey through neurovascular coupling in health and disease. **Neuron**, v. 96, n. 1, p. 17-42, Sep.2017.

IDRO, R.; JENKINS, N.E.; NEWTON, C.R.J.C. Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. **The Lancet Neurology**, v. 4, n. 12, p. 827-840, Dec.2005.

IGNARRO, L.J. et al. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9265-9269, Dec.1987.

IMIG, J.D. Epoxyeicosatrienoic acids and 20-hydroxyeicosatetraenoic acid on endothelial and vascular function. **Advances in Pharmacology**, v. 77, p. 105-141, May.2016.

JANSSEN, L.J. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 280, n. 6, p. L1067-L1082, Jun.2001.

JESPERSEN, J.S. et al. *Plasmodium falciparum* var genes expressed in children with severe malaria encode CIDR α 1 domains. **EMBO Molecular Medicine**, v. 8, n. 8, p. 839-850, Jun.2016.

KAMPOLI, A.M. et al. Novel agents targeting nitric oxide. **Current Vascular Pharmacology**, v.10, n.1, p.61-76, Jan.2012.

KIM, H. et al. Endothelial activation and dysregulation in malaria: a potential target for novel therapeutics. **Current Opinion in Hematology**, v. 18, n. 3, p. 177-185, May.2011.

KOUMURA, A. et al. Fasudil and ozagrel in combination show neuroprotective effects on cerebral infarction after murine middle cerebral artery occlusion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 338, n. 1, p. 337-344, Jul.2011.

KRAEMER, S.M.; SMITH, J.D. A family affair: var genes, PfEMP1 binding, and malaria disease. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 4, p. 374-380, Aug.2006.

LACERDA-QUEIROZ, N.; TEIXEIRA, M.M.; TEIXEIRA, A.L. Imunopatogênese da malária cerebral. **Revista Brasileira de Neurologia**, v.44, n.1, p.13-19, Jan./Feb./Mar.2008.

LEWALLEN, S. et al. Clinical-histopathological correlation of the abnormal retinal vessels in cerebral malaria. **Archives of Ophthalmology**, v. 118, n. 7, p. 924-928, Jul.2000.

LIU, X. et al. Contribution of epoxyeicosatrienoic acids to the cerebral blood flow response to hypoxemia. **Journal of Applied Physiology**, v. 119, n. 10, p. 1202-1209, Nov.2015.

LIU, Y. et al. Epoxyeicosanoid signaling provides multi-target protective effects on neurovascular unit in rats after focal ischemia. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 58, n. 2, p. 254-265, Nov.2015.

LIU, Y. et al. The protective effect of HET0016 on brain edema and blood–brain barrier dysfunction after cerebral ischemia/reperfusion. **Brain Research**, v.1544, p.45-53, Jan.2014.

LOPANSRI, B.K. et al. Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. **The Lancet**, v. 361, n. 9358, p. 676-678, Feb.2003.

LOU, J.; LUCAS, R.; GRAU, G.E. Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, n.4, p.810-820, Oct. 2001.

LOVEGROVE, F.E. et al. Serum angiopoietin-1 and 2 levels discriminate cerebral malaria from uncomplicated malaria and predict clinical outcome in African children. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, e4912, Mar.2009.

MACVICAR, B.A.; NEWMAN, E.A. Astrocyte regulation of blood flow in the brain. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 5, p. a020388, Mar.2015.

MAITLAND, K.; MARSH, K. Pathophysiology of severe malaria in children. **Acta Tropica**, v. 90, n. 2, p. 131-140, Apr.2004.

MARTINS, Y.C. et al. Slow and continuous delivery of a low dose of nimodipine improves survival and electrocardiogram parameters in rescue therapy of mice with experimental cerebral malaria. **Malaria Journal**, v. 12, n. 138, p. 1-11, Apr.2013.

MEIRER, K.; STEINHILBER, D.; PROSCHAK, E. Inhibitors of the arachidonic acid cascade: interfering with multiple pathways. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 1, p. 83-91, 2014.

MILNE, G.L.; DAI, Q.; ROBERTS II, L.J. The isoprostanes - 25 years later. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 433-445, Apr.2015.

MOERMAN, A.; DE HERT, S. Why and how to assess cerebral autoregulation? **Best Practice & Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 33, n. 2, p. 211-220, Jun.2019.

MOHANTY, S. et al. Brain swelling and mannitol therapy in adult cerebral malaria: a randomized trial. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 4, p. 349-355, Aug.2011.

MONCADA, S.; VANE, J.R. Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxides, thromboxane A₂, and prostacyclin. **Pharmacological Reviews**, v. 30, n. 3, p. 293-331, Sep.1978.

MOREIRA, A.S. **Papel de metabólitos do ácido araquidônico no processo de vasoconstrição na malária cerebral murina por *Plasmodium berghei* ANKA**. 2015. 105f. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2015.

MORROW, J.D. The isoprostanes – unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 8, p. 895-902, 2006.

NAKAHATA, N. Thromboxane A₂: physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 118, n. 1, p. 18-35, Apr.2008.

NELSON, J.W. et al. Role of soluble epoxide hydrolase in age-related vascular cognitive decline. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 113, p. 30-37, Oct.2014.

O'BRIEN, N.F. et al. Transcranial doppler ultrasonography provides insights into neurovascular changes in children with cerebral malaria. **The Journal of Pediatrics**, v. 203, p. 116-124. e3, Dec.2018.

ONG, P.K. et al. Nitric oxide synthase dysfunction contributes to impaired cerebroarteriolar reactivity in experimental cerebral malaria. **Plos Pathogens**, v.9, n.6, e1003444, Jun.2013.

ONG, P.K. et al. Reversal of cerebrovascular constriction in experimental cerebral malaria by L-arginine. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 15957, Oct.2018.

OREHEK, J. et al. Prostaglandin regulation of airway smooth muscle tone. **Nature New Biology**, v. 245, n. 142, p. 84, Sep.1973.

PAIN, A. et al. Platelet-mediated clumping of *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes is a common adhesive phenotype and is associated with severe malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 4, p. 1805-1810, Feb.2001.

PENET, M.F. et al. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: Significant role of ischemic brain edema. **The Journal of Neuroscience**, v. 25, n.32, p.7352-7358, Aug.2005.

PERKINS, D.J. et al. Impaired systemic production of prostaglandin E₂ in children with cerebral malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v.191, n.9, p.1548-1557, May.2005.

PERKINS, D.J.; KREMSNER, P.G.; WEINBERG, J.B. Inverse relationship of plasma prostaglandin E₂ and blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease severity in children with *Plasmodium falciparum* malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, n.1, p.113-118, Jan.2001.

PETZOLD, G.C.; MURTHY, V.N. Role of astrocytes in neurovascular coupling. **Neuron**, v.71, n.5, p.782-797, Sep.2011.

PHILLIS, J.W.; HORROCKS, L.A.; FAROOQUI, A.A. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. **Brain Research Reviews**, v. 52, n. 2, p. 201-243, Sep.2006.

PLEWES, K. et al. Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe falciparum malaria: an observational study. **BMC Infectious Diseases**, v. 17, n. 1, p. 313, Apr.2017.

POLDER, T.W.; JERUSALEM, C.R.; ELING, W.M.C. Morphological characteristics of intracerebral arterioles in clinical (*Plasmodium falciparum*) and experimental (*Plasmodium berghei*) cerebral malaria. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 101, n. 1, p. 35-46, Jul.1991.

POLOYAC, S.M. et al. Protective effect of the 20-HETE inhibitor HET0016 on brain damage after temporary focal ischemia. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 26, n. 12, p. 1551-1561, Dec.2006.

PONGPONRATN, E. et al. An ultrastructural study of the brain in fatal *Plasmodium falciparum* malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 4, p. 345-359, Oct.2003.

PONGPONRATN, E. et al. Microvascular sequestration of parasitized erythrocytes in human falciparum malaria: a pathological study. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 44, n. 2, p. 168-175, Feb.1991.

PRADHAN, A.A.; BERTELS, Z.; AKERMAN, S. Targeted nitric oxide synthase inhibitors for migraine. **Neurotherapeutics**, v. 15, n. 2, p. 391-401, Apr.2018.

PRUDÊNCIO, M.; RODRIGUEZ, A.; MOTA, M.M. The silent path to thousands of merozoites: The *Plasmodium* liver stage. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 11, p. 849-856, Nov.2006.

REMER, I. et al. In vivo noninvasive visualization of retinal perfusion dysfunction in murine cerebral malaria by camera-phone laser speckle imaging. **Journal of Biophotonics**, v. 12, n. 1, p. e201800098, Jan.2019.

RIGGLE, B.A.; MILLER, L.H.; PIERCE, S.K. Do we know enough to find an adjunctive therapy for cerebral malaria in African children? **F1000Research**, v. 6, n. 2039, p. 1-8, Nov.2017.

RINK, C.; KHANNA, S. Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 14, n. 10, p. 1889-1903, Apr.2011.

ROJAS, A. et al. The COX-2/prostanoid signaling cascades in seizure disorders. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 23, n. 1, p. 1-13, Dec.2018.

ROTHER, R.P. et al. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. **The Journal of the American Medical Association**, v. 293, n.13, p.1653-1662, Apr.2005.

SACERDOTI, D. et al. Arachidonic acid metabolites and endothelial dysfunction of portal hypertension. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 120, p. 80-90, Jul.2015.

SANNI, L.A. et al. Is ischemia involved in the pathogenesis of murine cerebral malaria? **American Journal of Pathology**, v.159, n.3, p.1105-1112, Sep.2001.

SEYDEL, K.B. et al. Brain swelling and death in children with cerebral malaria. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 12, p. 1126-1137, Mar.2015.

SHABANI, E. et al. *Plasmodium falciparum* EPCR-binding PfEMP1 expression increases with malaria disease severity and is elevated in retinopathy negative cerebral malaria. **BMC Medicine**, v. 15, n. 1, p. 183, Oct.2017.

SHAIK, J.S. et al. 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid inhibition by HET0016 offers neuroprotection, decreases edema, and increases cortical cerebral blood flow in a pediatric asphyxial cardiac arrest model in rats. **Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 35, n. 11, p. 1757-1763, Jun.2015.

SHRYOCK, N. et al. Lipoxin A₄ and 15-epi-lipoxin A₄ protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN- γ in the brain. **PloS ONE**, v.8, n.4: e61882, Apr.2013.

SILVA, L.S. et al. Kinins released by erythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* enhance adhesion of infected erythrocytes to endothelial cells and increase blood brain barrier permeability via activation of bradykinin receptors. **Frontiers in Medicine**, v. 6, n. 75, p. 1-9, Apr.2019.

SINGH, P.P., PRAKASH, B. Pathogenesis and experimental models of cerebral malaria: a review. **Journal of Pharmaceutical Microbiology**, v. 4, n. 1:3, p. 1-11, Apr.2018.

SINKA, M.E. et al. A global map of dominant malaria vectors. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 69, p. 1–11, Apr.2012.

SLIWA, K. et al. Prevention of murine cerebral malaria by a stable prostacyclin analog. **Infection and Immunity**, v.59, n.10, p.3846-3848, Oct.1991.

SOUZA, M.C. et al. Lipoxin A₄ attenuates endothelial dysfunction during experimental cerebral malaria. **International Immunopharmacology**, v.24, n.2, p.400-407, Feb.2015.

STORM, J. et al. Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. **EMBO Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. e9164, Feb.2019.

STORM, J.; CRAIG, A.G. Pathogenesis of cerebral malaria – inflammation and cytoadherence. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. 100, p. 1-8, Jul.2014.

TAKAHASHI, K. et al. Glomerular actions of a free radical-generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F₂ alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A₂ receptors. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 1, p. 136-141, Jul.1992.

TALAPKO, J. et al. Malaria: The past and the present. **Microorganisms**, v. 7, n. 6, pii. E179, Jun.2019.

TANNOUS, S.; GHANEM, E. A bite to fight: front-line innate immune defenses against malaria parasites. **Pathogens and global health**, v. 112, n. 1, p. 1-12, Feb.2018.

THUMWOOD, C.M. et al. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. **Parasitology**, v. 96, n. 3, p. 579-589, Jun.1988.

TURNER, G.D.H. et al. An immunohistochemical study of the pathology of fatal malaria: evidence for widespread endothelial activation and a potential role for intercellular adhesion molecule-1 in cerebral sequestration. **The American Journal of Pathology**, v. 145, n. 5, p. 1057-1069, Nov.1994.

TUTEJA, R. Malaria – an overview. **The FEBS Journal**, v. 274, n. 18, p. 4670-4679, Sep.2007.

VARO, R. et al. Adjunctive therapy for severe malaria: a review and critical appraisal. **Malaria Journal**, v. 17, n. 1, p. 47, Jan.2018.

WANG, L. et al. Neuroprotective effects of epoxyeicosatrienoic acids. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 138, p. 9-14, Sep.2018.

WHITE, N.J. *Plasmodium knowlesi*: The fifth human malaria parasite. **Clinical Infectious Disease**, v. 46, n. 2, p.172-173, Jan.2008.

WHITE, V.A. et al. Correlation of retinal haemorrhages with brain haemorrhages in children dying of cerebral malaria in Malawi. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6, p. 618-621, Dec.2001.

WHITE, V.A. et al. Retinal pathology of pediatric cerebral malaria in Malawi. **PLoS ONE**, v. 4, n. 1, e4317, Jan.2009.

WOLFE, M.M.; LICHTENSTEIN, D.R.; SINGH, G. Gastrointestinal toxicity of nonsteroidal antiinflammatory drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 340, n. 24, p. 1888-1899, Jun.1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines for the treatment of malaria. Geneva, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Management of severe malaria: A practical handbook. Geneva, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Severe falciparum malaria. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene**, v. 94, suppl.1, p.1-90, Apr.2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2018**.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **World Malaria Report 2019**.

XIAO, L. et al. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.60, n.4, p.668-673, Apr.1999.

YAMAMOTO, K. et al. Case report: reversible cerebral vasoconstriction syndrome in cerebral malaria. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 98, n. 2, p. 505-507, Feb.2018.

YAO, L. et al. Evans blue dye: A revisit of its applications in biomedicine. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v. 2018, p. 1-10, Apr.2018.

YEO, T.W. et al. Decreased endothelial nitric oxide bioavailability, impaired microvascular function, and increased tissue oxygen consumption in children with falciparum malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 10, p. 1627-1632, Nov.2014.

YEO, T.W. et al. Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine-reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. **Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 11, p. 2693-2704, Oct.2007.

YEO, T.W. et al. Recovery of endothelial function in severe falciparum malaria: relationship with improvement in plasma L-arginine and blood lactate concentrations. **The Journal of Infectious Diseases**, v.198, n.4, p.602-608, Aug.2008b.

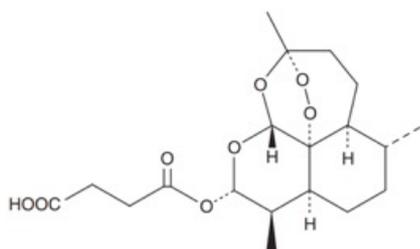
YEO, T.W. et al. Relationship of cell-free hemoglobin to impaired endothelial nitric oxide bioavailability and perfusion in severe falciparum malaria. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 10, p. 1522-1529, Nov.2009.

ZANINI, G.M. et al. Exogenous nitric oxide decreases brain vascular inflammation, leakage and venular resistance during *Plasmodium berghei* ANKA infection in mice. **Journal of Neuroinflammation**, v.8, n.66, p.1-9, Jun.2011.

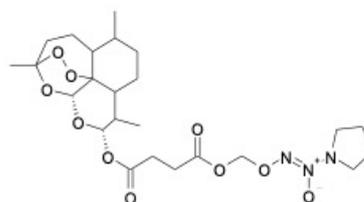
ZHANG, J. et al. Quantitative profiling of epoxyeicosatrienoic, hydroxyeicosatetraenoic, and dihydroxyeicosatetraenoic acids in human intrauterine tissues using liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, v. 365, n. 1, p. 40-51, Jun.2007.

9 APÊNDICES E/OU ANEXOS

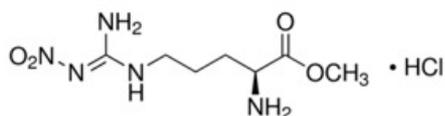
APÊNDICE A - ESTRUTURA QUÍMICA DAS DROGAS UTILIZADAS NESSE TRABALHO



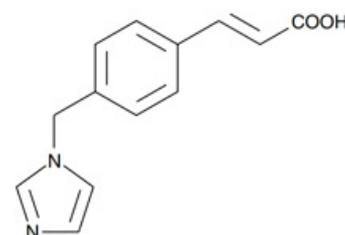
ARTESUNATO



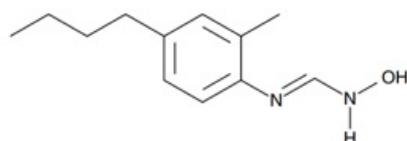
ART-NONO



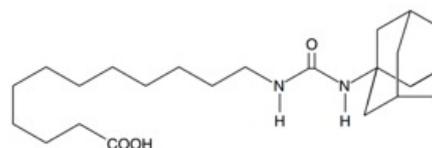
L-ARGININA



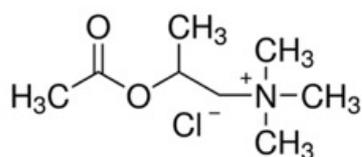
OZAGREL



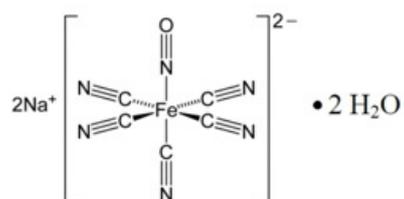
HET0016



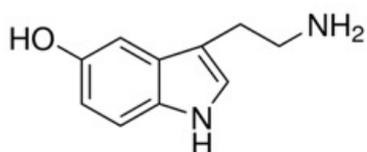
AUDA



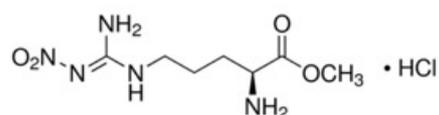
METACOLINA



NITROPRUSSIATO DE SÓDIO

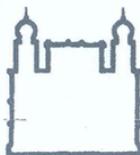


SEROTONINA



L-NAME

APÊNDICE B - LICENÇA CEUA



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-037/2015

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

Esta licença tem validade até 30/06/2019

Camundongo, cepa:

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

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

Rio de Janeiro, 16 de setembro de 2015.

Flávio Alves Lara

Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

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

OPEN **L-arginine supplementation and thromboxane synthase inhibition increases cerebral blood flow in experimental cerebral malaria**

Received: 4 July 2019
Accepted: 30 August 2019
Published online: 20 September 2019

Aline S. Moreira¹, Vanessa Estado², David C. Malvar³, Guilherme S. Sanches¹, Fabiana Gomes¹, Eduardo Tibirica⁴, Cláudio Tadeu Daniel-Ribeiro¹ & Leonardo J. M. Carvalho¹

Cerebral malaria pathogenesis involves vascular dysfunction with low nitric oxide (NO) bioavailability, vasoconstriction and impaired vasodilation, leading to ischemia, tissue hypoxia and ultimately death. Cerebral blood flow (CBF) involves NO and other pathways, including arachidonic acid (AA)-derived metabolites. Here we show that mice with experimental cerebral malaria (ECM) by *P. berghei* ANKA showed marked decreases in CBF (as assessed by laser speckle contrast imaging - LSCI) and that administration of L-arginine supplementation (50 mg/kg) and/or of the thromboxane synthase inhibitor Ozagrel (100 mg/kg) induced immediate increases in CBF. L-arginine in combination with artesunate (32 mg/kg) induced immediate reversal of brain ischemia in the short-term (1 hour), but the effect subsided after 3 and 6 hours. Neither L-arginine nor Ozagrel reversed blood brain barrier breakdown. Mice with ECM showed brain levels of selected AA-derived metabolites with a vasoconstrictor profile, with increased levels of 8-isoprostanes, 20-HETE and 14,15-DHET, whereas mice infected with a non-ECM-inducing strain of *P. berghei* (NK65) showed a vasodilator profile, with normal levels of 20-HETE and 14,15-DHET and increased levels of PGE₂. L-arginine is capable of partially reversing cerebral ischemia and AA metabolites may play a role in the cerebrovascular dysfunction in ECM.

Cerebral malaria, a deadly neurological complication of *Plasmodium falciparum* infection, shows features of a severe vasculopathy, which results in impaired perfusion, ischemia and hypoxia¹⁻⁴. In addition to microvascular congestion, endothelial dysfunction has been shown to occur in severe malaria possibly contributing to ischemia⁵. Patients with severe malaria show low nitric oxide (NO) bioavailability resulting in impaired microvascular function^{6,7}. Low levels of the NO synthase (NOS) substrate L-arginine and of the NOS cofactor tetrahydrobiopterin are also observed⁸⁻¹⁰, as well as disruption of NOS substrate/inhibitor homeostasis, all these factors limiting NO production^{11,12}. These findings prompted the proposal of L-arginine supplementation as a tool to improve vascular function in severe malaria and a number of safety and efficacy studies have been conducted in recent years¹³⁻¹⁵.

Vascular congestion and endothelial dysfunction are also observed in experimental cerebral malaria (ECM) by *Plasmodium berghei* ANKA infection in susceptible mice. Low NO bioavailability with hypoargininemia have been shown to be associated with pathogenesis¹⁶, and administration of exogenous NO donors prevented the neurological syndrome, ameliorating vascular function and decreasing vascular inflammation and congestion^{16,17}. ECM is associated with marked cerebral ischemia caused in part by widespread cerebrovascular constriction, which was ameliorated and even reversed with vasodilator drugs such as nimodipine and glyceryl trinitrate, when given as adjuvant therapy combined with artemisinin derivatives¹⁸⁻²¹. Moreover, pial vessels of mice with ECM present impaired vasodilator responses to acetylcholine and N-methyl-D-aspartate (NMDA), which induce vasodilation through mechanisms involving endothelial and neuronal NOS (eNOS and nNOS), respectively, indicating that both NO-producing enzyme isoforms are dysfunctional in ECM²². Importantly, cerebrovascular dilation

¹Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. ²Laboratory of Immunopharmacology, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. ³Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465/Km 07, 23897-000 Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil. ⁴National Institute of Cardiology, Rio de Janeiro, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.J.M.C. (email: leojmc@ioc.fiocruz.br)

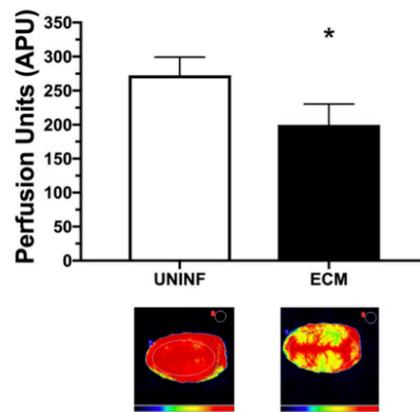


Figure 1. Cerebral blood flow (CBF) of mice with experimental cerebral malaria (ECM) and uninfected controls. CBF (measured as arbitrary perfusion units, APU) of mice with ECM ($n = 16$) and uninfected control mice (UNINF, $n = 11$). Mice were anesthetized with urethane, kept at 36°C , had the skull exposed and were subjected to laser speckle contrast imaging (LSCI) measurements of CBF. Mice with ECM showed significant decreases in CBF ($p < 0.0001$). Data are presented as mean \pm standard deviation. Images at the bottom are representative of CBF for each group as acquired by LSCI.

was restored with direct L-arginine superfusion in pial vessels²³, and systemic administration of L-arginine at various doses were shown to partially reverse or prevent the aggravation of cerebral vasoconstriction in ECM, and in association with artesunate increased survival of mice with late stage disease²³.

NO is a central and ubiquitous modulator of vascular tone, but regulation of cerebral blood flow (CBF) is highly complex and involves a number of vasoactive molecules that control blood supply to the different areas of the brain according to demand, in a close interplay with NO biology^{24,25}. Among these pathways, the balance of vasoactive arachidonic acid (AA) metabolites plays important roles in CBF regulation. Under hypoxic and pro-oxidant conditions, AA may undergo non-enzymatic oxidation and generate potent constrictive metabolites such as isoprostanes^{26,27}. In addition, AA is the substrate for several enzymes that generate vasoactive metabolites, which may have either vasodilator (e.g., prostaglandin E2 [PGE2], epoxyeicosatrienoic acid [EET]) or vasoconstrictor (e.g., 20-hydroxyeicosatetraenoic acid [20-HETE], thromboxane A2 [TxA2], leukotrienes) activities. Therefore, cerebrovascular constriction in ECM could be at least in part explained by excessive generation of AA metabolites with a vasoconstrictor profile. In human malaria, lower levels of the vasodilator PGE2 correlated with disease severity²⁸, and reduced PGE2 was shown to occur through hemozoin-induced inhibition of cyclooxygenase-2 (COX-2) in mononuclear cells via an interleukin-10-dependent mechanism²⁹. In ECM, sick mice had increased phospholipase A2 mRNA expression in the spleen, and treatment of mice with the prostaglandin synthesis inhibitor aspirin was detrimental³⁰. Also, increased COX-2 expression in the brain was observed in mice with ECM, but not in malaria-infected mice with no neurologic involvement³¹.

In the present study we investigated two different and interrelated approaches to reverse cerebral ischemia in mice with late-stage ECM, asking: (a) whether the described effect of L-arginine in dilating cerebral vessels or preventing the aggravation of vasoconstriction indeed results in substantial increases in cerebral blood flow (CBF); (b) whether the pharmacological inhibition of the synthesis of the potent AA-derived vasoconstrictor thromboxane A2, alone or in combination with L-arginine supplementation, results in increased CBF in ECM, as a first effort to address the role of AA metabolites in ECM cerebrovascular dysfunction. We also determined the levels of relevant AA metabolites (8-isoprostanes, TxA2, 20-HETE, PGE2, and 14,15-dihydroxy-5Z,8Z,11Z-eicosatrienoic acid [14,15-DHET]) in the brain of mice with ECM or infected with a *P. berghei* strain (NK65) that does not cause ECM.

Results

Parasitemia and temperature. ECM mice that were used in the experiments were hypothermic, with rectal temperatures between 31°C and 36°C . At the time of ECM, mice showed parasitemia ranging from 4.0% to 29.5%. In each experiment, rectal temperature and parasitemia did not differ between groups.

Mice with ECM show decreased cerebral blood flow (CBF). In line with our previous studies using intravital microscopy^{19,32}, mice with ECM presented a marked decrease in CBF (mean: 199.9 ± 30 APU) compared to uninfected controls (mean: 272.5 ± 27 APU), as verified by LSCI (Fig. 1).

Treatment with L-arginine increases CBF in mice with ECM. We have previously shown that systemic administration of L-arginine at different doses prevents aggravation and may even partially reverse cerebrovascular constriction in ECM²³. We asked whether this beneficial effect on pial vessels actually results in increased CBF

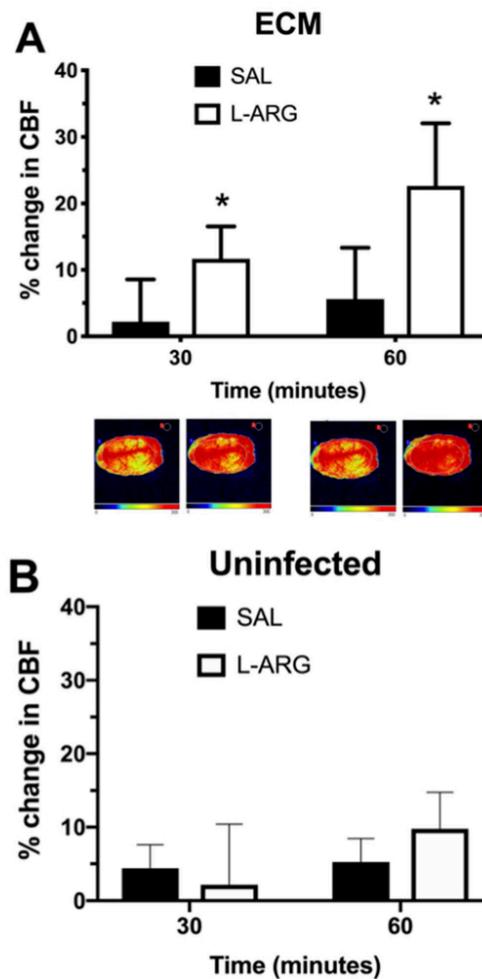


Figure 2. Cerebral blood flow (CBF) of mice with experimental cerebral malaria (ECM) or uninfected mice treated with L-arginine or saline. Percent change in CBF of mice with ECM (**A**) or uninfected mice (**B**) treated with L-arginine (L-ARG) 50 mg/kg or vehicle (saline - SAL), 200 μ L, subcutaneously. Mice were anesthetized with urethane, kept at 36 °C, had the skull exposed and were subjected to laser speckle contrast imaging (LSCI) measurements of CBF before and continuously after dosing, for 60 minutes. Mice with ECM that received L-arginine (n = 5) showed higher increases in CBF than mice that received saline (n = 6), at 30 and 60 minutes ($p = 0.0071$). Data are presented as median \pm interquartile range. Images at the bottom are representative of CBF for each group as acquired by LSCI. Uninfected mice that received either L-arginine (n = 4) or saline (n = 4) showed increased CBF at 60 minutes, however the difference between groups (L-arginine and saline) was not significant.

as measured by LSCI. Indeed, administration of L-arginine 50 mg/kg resulted in a median 26.2% (IQR: 9–31%) increase in CBF after 60 minutes, compared to a median 5.0% (IQR: -7–16%) increase in mice that received saline (Fig. 2A). The effect of treatment in mice with ECM was more pronounced than the effect observed after administration of L-arginine to uninfected mice, which led to a median 8.7% (IQR: 5.3–16.4%) increase in CBF after 60 minutes (Fig. 2B).

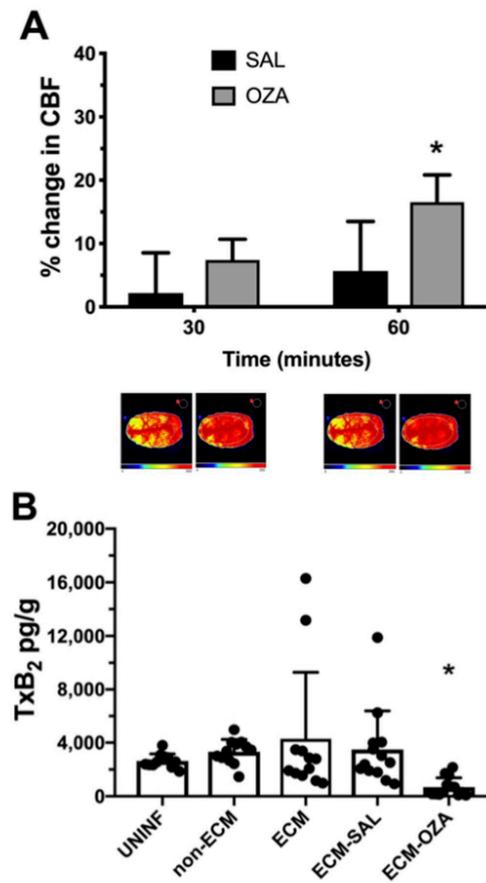


Figure 3. Cerebral blood flow (CBF) and thromboxane A₂ levels (measured by detection of its derivative TxB₂) in mice with experimental cerebral malaria (ECM) treated with Ozagrel or saline. **(A)** Percent change in CBF in mice with ECM treated with the thromboxane synthase inhibitor Ozagrel (OZA) 100 mg/kg or vehicle (saline - SAL), 200 μ L, subcutaneously. Mice were anesthetized with urethane, kept at 36 °C, had the skull exposed and were subjected to laser speckle contrast imaging (LSCI) measurements of CBF before and continuously after dosing, for 60 minutes. Mice with ECM that received Ozagrel (n = 6) showed higher increases in CBF than mice that received saline (n = 6), at 60 minutes (p = 0.032). Data are presented as median \pm interquartile range. Images at the bottom are representative of CBF for each group as acquired by LSCI. **(B)** Thromboxane B₂ (TxB₂, a stable metabolite of TxA₂) levels in the brains of uninfected mice (UNINF), mice infected with *P. berghei* NK65 (non-ECM), mice with ECM untreated (ECM), and after one hour of treatment with saline (ECM-SAL) or Ozagrel (ECM-OZA). TxB₂ levels were not different between the first four groups, but ECM mice that were treated with Ozagrel showed a marked (>80%) decrease in TxB₂ levels in relation to ECM mice untreated or treated with saline (p < 0.0001). Data are presented as mean \pm standard deviation.

Treatment with the thromboxane synthase inhibitor Ozagrel increases CBF in mice with ECM. Thromboxane A₂ (TxA₂) is one of the most potent vasoconstrictors acting in brain vessels, and also induces platelet aggregation, both events observed in ECM. We asked whether administration of Ozagrel, a thromboxane synthase inhibitor, to mice with ECM would lead to arteriolar relaxation and increased CBF. In fact, treatment of sick mice with Ozagrel (100 mg/kg) resulted in a significant increase in CBF (median: 16.8%; IQR: 10.3–23%) after 60 minutes, compared to mice receiving only vehicle (Fig. 3A). Brain levels of TxA₂ (measured by detection of its derivative TxB₂) were not significantly different in mice with ECM compared to uninfected controls or mice infected with a *P. berghei* strain (NK65) that does not cause ECM (“non-ECM”), although some ECM mice

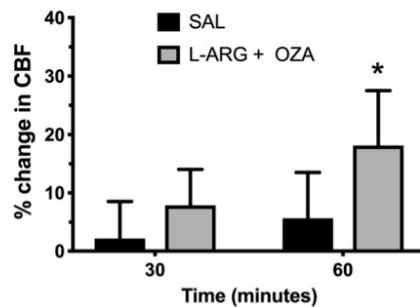


Figure 4. Cerebral blood flow (CBF) of mice with experimental cerebral malaria (ECM) treated with L-arginine and Ozagrel combined. Percent change in CBF in mice with ECM treated with L-arginine + Ozagrel (L-ARG + OZA, 50 mg/kg and 100 mg/kg, respectively) or vehicle (saline – SAL), 200 μ L, subcutaneously. Mice were anesthetized with urethane, kept at 36 °C, had the skull exposed and were subjected to LSCI measurements of CBF before and continuously after dosing, for 60 minutes. Mice with ECM that received the combination of L-arginine and Ozagrel ($n = 7$) showed higher increases in CBF than mice that received saline ($n = 6$), at 60 minutes ($p = 0.0463$). Data are presented as median \pm interquartile range.

showed very high levels (Fig. 3B). In any case, brain TxA2 levels plummeted upon administration of Ozagrel to mice with ECM (an 80% decrease compared to mice with ECM before treatment or after treatment with saline) (Fig. 3B).

Combined administration of L-arginine and Ozagrel has no additive or synergistic effects. Because both Ozagrel and L-arginine induced marked increases in CBF after 60 minutes in mice with ECM, we asked whether combination of the two compounds would have any additive effect. The combination in fact induced an increase in CBF, however it was not superior to each compound administered alone (Fig. 4).

Treatments with Ozagrel or L-arginine combined with artesunate do not reverse breakdown of the blood-brain barrier (BBB) in mice with ECM. Mice with ECM showed increased Evans blue dye extravasation to the brain 6 h after saline administration, indicating breakdown of the BBB (Fig. 5A). Treatment with artesunate plus Ozagrel or L-arginine did not have any effect on dye extravasation (Fig. 5A). No significant changes in wet brain weight were observed in mice with ECM before or after treatment with artesunate plus saline, L-arginine or Ozagrel, in relation to uninfected control mice (Fig. 5B). Artesunate was capable of decreasing parasitemia by nearly half in all treated groups 6 hours after treatment (Fig. 5C).

Treatment with L-arginine in combination with artesunate improves CBF and prevents aggravation of cerebral ischemia in mice with ECM. Since L-arginine showed better performance in increasing CBF in mice with ECM, we asked whether this effect could be sustained in a setting of adjuvant therapy with artesunate. Mice with ECM were treated with artesunate (32 mg/kg, intraperitoneal) and either saline or L-arginine 50 mg/kg and CBF was checked at 1 hour, 3 hours and 6 hours. At the 1-hour timepoint, animals that received artesunate plus L-arginine showed increased CBF (mean $25.2 \pm 13\%$) in relation to ECM mice before treatment, and CBF in this group was significantly higher than in mice receiving artesunate plus saline (Fig. 6). Indeed, CBF of ECM mice treated with artesunate plus L-arginine at 1 hour was not different from that of uninfected controls, showing that the treatment reversed ischemia. The effect of L-arginine treatment was transient, as at the 3- and 6-hour timepoints CBF returned to pre-treatment levels and was not different from animals that received saline.

Mice with ECM show increased levels of vasoconstrictor AA metabolites in the brain. As described above, TxA2 levels were not changed in mice with ECM, but inhibition of TxA2 production by Ozagrel in these mice induced substantial increases in CBF (Fig. 3). We asked whether the cerebrovascular constriction observed in ECM could be associated with a dysregulation of other AA metabolites in the brain. Indeed, mice with ECM showed marked increases in the levels of the potent vasoconstrictor 20-HETE (Fig. 7A) and also of 14,15-DHET (Fig. 7B) in relation to uninfected controls, whereas the levels of these AA metabolites did not change significantly in mice infected with *Plasmodium berghei* NK65, which does not cause cerebral malaria (non-ECM mice). On the other hand, brain levels of the vasodilator AA metabolite PGE2 were increased in the brain of non-ECM mice and unchanged in mice with ECM in relation to uninfected controls (Fig. 7C). Brain levels of 8-isoprostanes, which are vasoconstrictor AA metabolites generated non-enzimatically by oxidative stress, were increased in mice with ECM as well as in mice infected with PbNK65 compared to uninfected animals (Fig. 7D). We also asked whether inhibition of thromboxane synthase (which, like PGE2 synthase, uses PGH as substrate) by Ozagrel might influence the levels of PGE2 and 8-isoprostanes. Ozagrel treatment did not affect the levels of PGE2, but led to decreased levels of 8-isoprostanes (Fig. 7C,D). Overall, these findings suggest that mice with ECM indeed present a shift in AA metabolism favouring the production of vasoconstrictor over vasodilator metabolites, and that a better balance is achieved by mice infected with a non-ECM-inducing parasite.

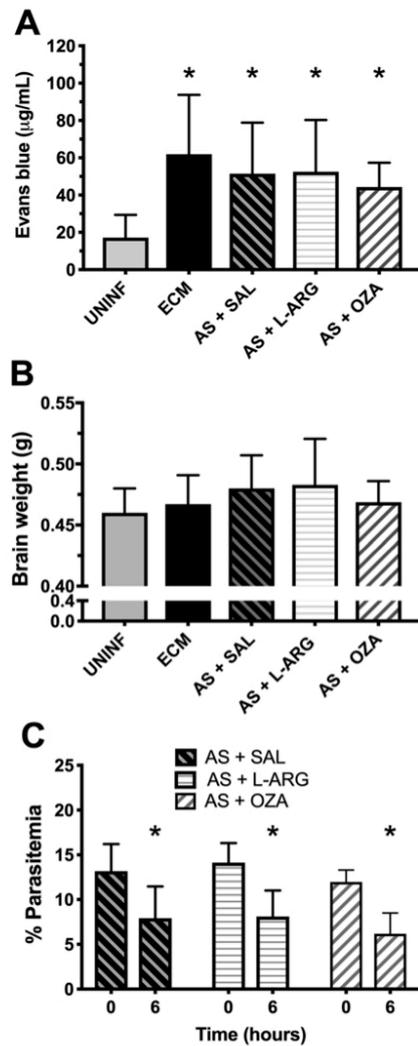


Figure 5. Blood brain barrier permeability, brain weight and parasitemia in mice treated with artesunate plus L-arginine or Ozagrel. (A) Blood brain barrier permeability measured by concentration of extravasated Evans blue dye in brain tissue. Evans blue dye was intravenously injected in mice 5 hours after treatment and allowed to circulate for one hour and then mice were subjected to euthanasia and the brain harvested. All groups, mice with ECM untreated (ECM) or treated with artesunate (AS) plus either saline (SAL), L-arginine (L-ARG) or Ozagrel (OZA), showed increased permeability (high levels of Evans blue) compared to uninfected control mice (UNINF) ($p < 0.0001$) ($n = 8-15$ mice per group). There were no differences between the infected groups, treated or not. (B) Wet brain weight of the brain of uninfected and mice with ECM untreated or treated with artesunate plus saline, L-arginine or Ozagrel. No significant differences in brain weight were observed between the groups. (C) Effect of artesunate treatment on the parasitemia of mice with ECM treated with artesunate plus saline, L-arginine or Ozagrel. In all groups, artesunate led to a reduction of around 40% in parasitemia after 6 hours. Data are presented as mean \pm standard deviation.

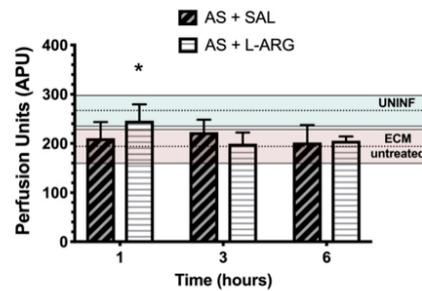


Figure 6. Cerebral blood flow (CBF) in mice with ECM treated with artesunate plus L-arginine or saline. CBF (measured as arbitrary perfusion units, APU) in mice with ECM treated with artesunate (AS) 32 mg/kg, intraperitoneally and either L-arginine (L-ARG) 50 mg/kg or vehicle (saline – SAL). Mice were anesthetized with urethane, kept at 36 °C, had the skull exposed and were subjected to LSCI measurements of CBF. Measurements were made in separate groups of animals 1 hour, 3 hours and 6 hours after treatment, and shown as bars in the figures (n = 4–8 mice per group). The mean \pm standard deviation of CBF of uninfected control mice (UNINF) or mice with ECM untreated are shown as dotted lines (mean) and coloured horizontal boxes (standard deviation); pale green for uninfected controls and pale red for mice with ECM), to allow comparison throughout the timepoints. Comparisons were made between the treated groups (SAL versus L-ARG) at each timepoint. Mice treated with artesunate plus L-arginine showed higher CBF than mice treated with artesunate plus saline at 1 hour ($p = 0.0262$). Data are presented as mean \pm standard deviation.

Discussion

Cerebral malaria is a severe vasculopathy characterized by phenomena such as blockade of the cerebral microcirculation by pRBCs and leukocytes, inflammation, endothelial activation and dysfunction, ischemia/hypoxia and breakdown of the blood-brain barrier with resulting edema. We have previously shown that ECM is associated with a process of cerebrovascular constriction that limits CBF, and that this process is characterized by low NO bioavailability and endothelial and neuronal nitric oxide synthase (NOS) dysfunction^{17,19,22,32}. Recently, we have shown that direct superfusion of the NOS substrate L-arginine on pial vessels of mice with ECM induced immediate dilation. Moreover, systemic administration of L-arginine, combined or not with artesunate, was shown to prevent aggravation of cerebrovascular constriction. These benefits of L-arginine on cerebral microcirculation were associated with increased survival²³.

In the present study we showed that the previously observed pial vasoconstriction in mice with ECM is indeed paralleled by a marked decrease in CBF. In human CM, cerebral ischemia has been suggested by findings of vascular occlusion mainly in post-mortem studies and also in retinoscopy and magnetic resonance imaging (MRI) analyses^{33–35}. *Plasmodium berghei* ANKA-infected mice develop a neurological syndrome (ECM) that resembles more the pediatric than the adult human CM, with vascular occlusion, brain edema and breakdown of the blood brain barrier^{18,36}. Impaired brain perfusion has been shown in ECM using MRI and brain intravital microscopy^{18,19,23}. Therefore, vascular dysfunction and occlusion leading to ischemia seem to be critical factors in the pathogenesis and lethality of cerebral malaria, and interventions to restore cerebral perfusion are expected to impact patient's survival and recovery. In human severe and moderately severe malaria, infusion of L-arginine improved peripheral vascular responses and increased NO bioavailability^{13–15,37}. Limitations of human CM studies, however, makes it difficult to assess the vascular and blood flow responses where it is highly relevant, in the brain. Therefore, the finding of the present study that L-arginine infusion indeed results in immediate increases of CBF in ECM is of critical importance.

When used in combination with artesunate as adjunctive therapy to ECM, again L-arginine was found to induce increased CBF in the short-term (1 hour) in mice with ECM, actually restoring cerebral perfusion to levels not different from uninfected controls. The increase in CBF subsided 3 and 6 hours after treatment. Although transient, this initial reversal of cerebral ischemia may help the very sick mice with late-stage ECM to preserve brain function better than mice receiving only artesunate. Indeed, this effect of L-arginine on CBF is associated with increased survival²³.

NO is a central regulator of vascular tone and therefore an obvious target in diseases running with low NO bioavailability and vascular dysfunction such as cerebral malaria. However, regulation of CBF in the brain is highly complex and a number of mechanisms act in concert affecting vascular tone^{24,38,39}. Astrocytes play a central role in this process. In physiological conditions, following signalling by neuron-derived glutamate, metabotropic receptors on astrocytes are engaged, increasing intracellular Ca^{2+} and activating phospholipase A2 (PLA2), which releases arachidonic acid (AA) from membrane phospholipids. AA can then be processed by different enzymes such as cyclooxygenases, lipoxygenases, CYP450 epoxygenases, and downstream by others such as thromboxane synthase, leading to the generation of vasoactive derivatives. Depending on the pathways that are activated, vasodilator or vasoconstrictor responses will ensue leading to respectively increased or decreased blood flow to the specific area of the brain where the response is taking place^{24,25}. In ECM, cerebrovascular constriction leading to ischemia is observed at the late stages of the disease. In addition to low NO bioavailability, it has been shown that

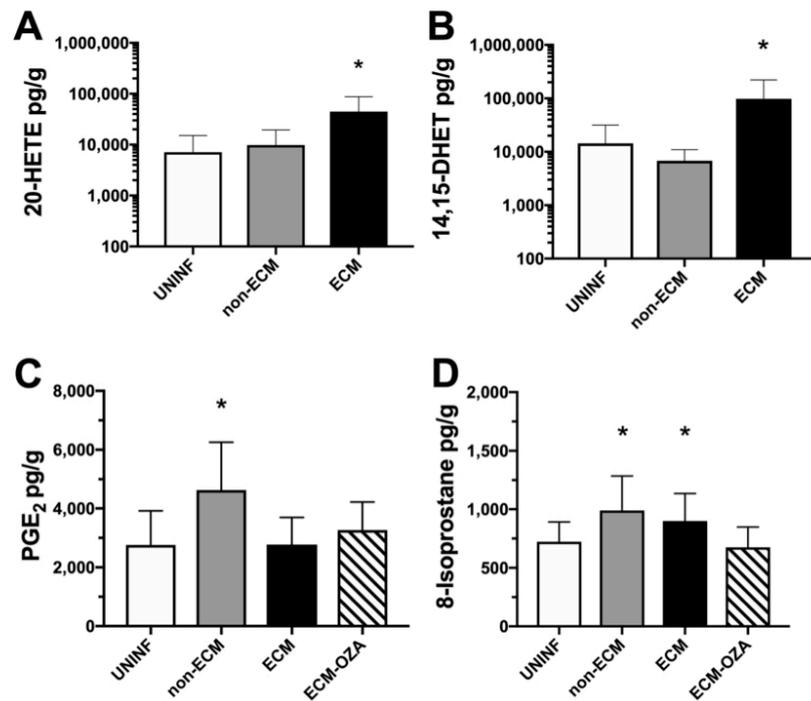


Figure 7. Levels of arachidonic acid metabolites in the brain of mice with ECM. Uninfected control mice (UNINF), mice infected with *P. berghei* NK65 (non-ECM) and mice with ECM were subjected to euthanasia and had the brains harvested and processed for measurement of selected arachidonic acid metabolites (20-HETE, 14,15-DHET, PGE₂ and 8-isoprostanes) by ELISA. In the case of PGE₂ and 8-isoprostanes, brain samples from mice with ECM treated with Ozagrel (OZA) were also assayed (n = 11–20 mice per group, in two independent experiments). (A) Mice with ECM showed marked increases in the brain levels of 20-HETE in relation to uninfected control and non-ECM mice (p = 0.0031). (B) Mice with ECM showed marked increases in the brain levels of 14,15-DHET in relation to uninfected control and non-ECM mice (p = 0.0005). (C) Non-ECM mice showed increased levels of PGE₂ in relation to uninfected controls and mice with ECM (p = 0.0274). ECM mice treated with Ozagrel (ECM-OZA) showed PGE₂ levels similar to uninfected controls. (D) Mice with ECM and non-ECM showed increased levels of 8-isoprostanes in relation to uninfected controls (p = 0.0055). There was no difference between the levels of 8-isoprostanes between ECM and non-ECM mice. Mice with ECM treated with Ozagrel showed 8-isoprostane levels similar to uninfected controls. Data are presented as mean ± standard deviation.

potent vasoconstrictors such as endothelin-1 are increased in ECM⁴⁰, and that vasoconstrictor leukotrienes were deleterious, whereas vasodilator prostaglandins were beneficial, in ECM^{30,31}. These findings suggest that ECM pathogenesis might disturb AA metabolism in the brain, leading to predominant generation of vasoconstrictor over vasodilator AA metabolites, and that this disturbance would contribute to the decreased CBF observed in these animals. The data presented in present study are in agreement with this assumption.

We first explored the effect of thromboxane synthase inhibitors in the brain thromboxane A₂ (TxA₂) concentration and in CBF of mice with ECM. TxA₂ is a potent vasoconstrictor produced by astrocytes as well as by activated platelets. Little is known about any role of TxA₂ in ECM pathogenesis, although an early hypothesis proposed that TxA₂ would exert deleterious effects in malaria through its vasoconstrictor and platelet aggregation properties whereas prostacyclin, with the opposite profile, would be protective⁴¹. A recent study with a limited number of plasma samples from uncomplicated and severe malaria patients indicated that TxA₂ plasma levels were lower in malaria than in uninfected healthy controls⁴². However, plasma levels of TxA₂ may be more representative of systemic production by platelets, whereas the local astrocyte source may be more relevant for the brain levels as measured here. Our data showed that mice with ECM present variable levels of TxA₂ in the brain, in some cases very high levels, but overall no significant differences were observed when compared to uninfected controls or mice with non-cerebral malaria. However, systemic administration of the thromboxane synthase inhibitor Ozagrel caused a marked decrease in brain TxA₂ levels in mice with ECM and this was associated

with increased in CBF as measured by LSCE. These data suggest that blocking even the basal TxA2 generation in the brain can be of benefit to reverse vasoconstriction and restore blood flow in mice with ECM. In addition, it is possible that Ozagrel may present off-target effects and induces increased CBF by mechanisms other than thromboxane synthase inhibition.

The AA-related pathways of CBF control do not act independently, but in a balance between their own products and in concert with a number of other pathways, including NO production by endothelial cells and neurons²⁴. NO influences and is influenced by different AA metabolites. For instance, NO inhibits 20-HETE synthesis and therefore induces vasodilation by this mechanism⁴³. Also, low NO bioavailability can be associated with activation of thromboxane receptors, and NOS inhibition increases TxA2 production^{44,45}. Conversely, increased NO production suppresses TxA2 release. We therefore asked whether combining the treatments targeting different pathways (increasing NO with L-arginine and decreasing TxA2 with Ozagrel) would result in an additive or synergistic effect. However, the combination resulted in an increase in blood flow that was not better than each treatment alone. This finding may be explained by the very fact that the different pathways of CBF regulation actually interact and are redundant and complementary.

Low NO bioavailability and increased levels of TxA2 affect vascular diameters, inducing vasoconstriction, and can also lead to increased vascular permeability and breakdown of the blood-brain barrier, a hallmark of ECM³⁶. We asked whether L-arginine or Ozagrel treatments might have a benefit on this parameter, in addition to the effects on CBF. However, ECM mice treated with artesunate and either L-arginine or Ozagrel showed cerebral vascular leakage of Evans blue dye similar to untreated ECM mice or ECM mice treated with artesunate and saline indicating no benefit effect of these drugs on breakdown of the blood-brain barrier.

In addition to CBF and blood-brain-barrier permeability, L-arginine supplementation may affect many other parameters that were not assessed in this study. For instance, in addition to NO synthesis it may affect the urea cycle as well as protein and polyamine synthesis, potentially affecting ECM treatment outcome. Polyamines, for instance, have been shown to be important for malaria parasites and also in the physiology and metabolism of the nervous system^{46,47}. Both human and mouse cerebral malaria cause depletion of arginine, citrulline and ornithine, due to a marked decrease in arginine appearance⁹. It is possible that ornithine depletion can also result from increased conversion to polyamines, proline and glutamate, and these pathways may be affected by L-arginine supplementation. Further research is needed to explore these mechanisms.

Since thromboxane synthase inhibition was shown to increase CBF in mice with ECM, we assessed how the disease affected the levels of other relevant vasoactive AA metabolites. First, mice with either ECM or non-cerebral malaria presented increased levels of 8-isoprostanes compared to uninfected controls. The 8-isoprostanes are generated by non-enzymatic oxidation of AA^{48,49}, therefore malaria infection per se induced significant oxidative stress. Increased plasma and urine levels of 8-isoprostanes have been reported in human and mouse severe malaria⁵⁰⁻⁵². 8-isoprostanes are recognized as potent vasoconstrictors⁵³⁻⁵⁵ and, interestingly, cause toxicity on endothelial cells, which was related to increased TxA2 formation and was prevented by thromboxane synthase inhibitors⁵⁶. This is consistent with the finding in this study that treatment of mice with ECM with the thromboxane synthase inhibitor Ozagrel led to decreased levels not only of TxA2 itself but also of 8-isoprostanes. The mechanism by which Ozagrel causes a decrease in 8-isoprostane levels in ECM, however, is not clear. Since 8-isoprostanes are generated non-enzymatically by oxidative stress^{48,49}, improved CBF and hence improved tissue oxygenation and washout of metabolic waste resulting from Ozagrel treatment may contribute to decreasing oxidative stress and 8-isoprostane formation in the brain. Further research is needed to address these possibilities, and also to determine whether Ozagrel and also L-arginine treatments affect the levels of other AA metabolites such as 20-HETE and 14,15-DHET.

Since both ECM and non-ECM mice showed increased levels of brain 8-isoprostanes, it appears that this mediator cannot per se be associated with the pathogenesis of ECM, or in the cerebral vasoconstriction observed in this syndrome¹⁹. Nevertheless, the brain levels of the enzymatically-generated AA derivatives indicate that in ECM the balance leans towards a vasoconstrictor over a vasodilator response, and the opposite occurs in non-ECM. ECM mice showed increased levels of 20-HETE and 14,15-DHET, while keeping levels of PGE2 unchanged. Conversely, non-ECM mice showed increased levels of PGE2 and no significant changes in 20-HETE and 14,15-DHET levels.

The profile of PGE2 response - increased in non-ECM and unchanged in ECM - is in line with previous studies showing that prostaglandins are protective in ECM. One study showed that mice with ECM had increased phospholipase A2 mRNA expression in the spleen, and that treatment of mice with the prostaglandin synthesis inhibitor aspirin was detrimental³⁰. Another study showed that increased COX-1 expression was observed in models of cerebral and non-cerebral malaria, whereas increased COX-2 expression in the brain was observed only in mice with ECM³¹. As in the case of treatment with aspirin, treatment with the COX-2 inhibitor celecoxib was detrimental. In human malaria, lower levels of PGE2 were also correlated with disease severity²⁸, and reduced PGE2 was shown to occur through hemozoin-induced inhibition of COX-2 in mononuclear cells via an interleukin-10-dependent mechanism²⁹. PGE2 is an important inflammatory mediator, but it is also a key vasodilator molecule produced to regulate blood flow in the brain. Therefore, the increased levels of PGE2 observed in non-ECM but not in ECM mice could be protective, helping to prevent cerebral vasoconstriction.

The brain levels of 14,15-DHET were increased in mice with ECM, but not in non-ECM. The magnitude of the increase was substantial, with ECM mice showing on average several fold increases in relation to non-ECM mice and to uninfected controls. 14,15-DHET is a major metabolite of epoxy-eicosatrienoic acids (EETs), which are produced by the conversion of AA by CYP450 in astrocytes. EETs are vasodilator AA metabolites, with critical roles in the regulation of CBF in physiological conditions⁵⁷. EETs are metabolized by soluble epoxide hydrolases (sEH) to inert products such as 14,15-DHET. Increased activity of sEH, generating increased levels of DHETs, therefore prevents the vasodilator action of EETs, resulting in vasoconstriction⁵⁵. Indeed, patients with vascular

cognitive impairment were shown to exhibit increased sEH expression and increased levels of 14,15-DHET in the cerebral microcirculation⁵⁸.

Finally, the levels of the potent vasoconstrictor 20-HETE were also markedly elevated in mice with ECM. Whether low NO bioavailability, known to occur in ECM, plays a role in generating high levels of 20-HETE, as observed in this study, as it prevents physiological inhibition of CYP4A, or it is the opposite, that is, ECM induces increased production of 20-HETE that in turn promotes low NO bioavailability and endothelial dysfunction, or both, remains to be demonstrated. But all these data are consistent with a pro-vasoconstrictor ambience in ECM.

In summary, the data presented here further confirm that L-arginine supplementation results in transient but relevant reversal of cerebral ischemia in ECM. The data also demonstrate that the balance of selected vasoactive AA metabolites, produced in the neurovascular unit and known to play key roles in the regulation of CBF, is altered in mice with ECM, assuming a vasoconstrictor profile, whereas non-ECM mice present a vasodilator profile. Targeted inhibition of a selected AA-derived vasoconstrictor, thromboxane A₂, led to immediate increase in CBF, which was not further incremented by concomitant NO-inducing treatment strategy (L-arginine). The data presented here indicate that more in-depth characterization of neurovascular unit alterations in ECM and its manipulation may provide new insights on ECM pathogenesis and therapeutics, particularly in relation to vascular pathology.

Material and Methods

Animals. Eight-to-ten-week-old female C57BL/6 mice (18–20 g) from the Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) breeding unit (ICTB) were used for the studies. The animals were kept at constant temperature (22–24 °C) with free access to chow and water in 12-hour light/dark cycle. All experiments were performed in accordance with relevant guidelines and regulations. The Animal Welfare Committee of the FIOCRUZ under license number LW33/10, LW29/13 and L-037/15 (CEUA/FIOCRUZ) approved the experiments in these studies.

Parasites and infection. C57BL/6 red blood cells infected with *Plasmodium berghei* ANKA expressing the green fluorescent protein (PbA-GFP, a donation from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center-MR4, Manassas, VA; deposited by C.J. Janse and A.P. Waters; MR4 number: MRA-865) or *Plasmodium berghei* NK65 (PbNK65) previously kept in liquid nitrogen were thawed and intraperitoneally (i.p.) inoculated into healthy mice that served as parasite donor for the infection of experimental groups. Eight-to-ten-week-old female C57BL/6 mice were intraperitoneally inoculated with 1×10^6 red blood cells parasitized by PbA (PbA-GFP pRBC) or with 1×10^6 PbNK65 pRBC (day 0 of infection). Parasitemia was checked by microscopical examination of Giemsa-stained blood smears or by flow cytometry (PbA-GFP). For rectal temperature measurement, a thermocouple probe (Oakton[®] Acorn TM; Oakton Instruments, IL, USA) was used. On day 6 post-infection, PbA-infected animals with rectal temperature range between 31 and 36 °C were used in the study¹⁹.

Treatments. A first set of experiments was designed to verify the short-term (1 h), immediate CBF responses to each drug (L-arginine, Ozagrel, isolated or combined) or control vehicle (saline) in mice with late-stage ECM. On day 6 after inoculation, parasitemia and rectal temperature were checked. Mice presenting hypothermia (31–36 °C), which indicates late-stage ECM, were randomly assigned to drug (L-arginine and/or Ozagrel) or control (saline) groups. The parasitological (parasitemia) and clinical (rectal temperature) data were compared a posteriori between groups to verify eventual bias in group assignment. Mice received L-arginine (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) 50 mg/kg, and/or the thromboxane synthase inhibitor Ozagrel (Tocris Bioscience) 100 mg/kg, in saline, in final volume of 200 µL, subcutaneously (s.c.). Control mice received 200 µL of saline. For the assessments (CBF and vascular permeability) requiring longer delays (1–6 hours) between treatment and measurements, L-arginine, Ozagrel or saline were given as described above, in combination with artesunate (Sigma) given intraperitoneally at 32 mg/kg in 5% sodium bicarbonate solution. The dose and treatment scheme for artesunate were defined in a previous study⁵⁹. Since continuous intravenous infusion, as done in humans, is not practical in mice, a higher single daily intraperitoneal dose of artesunate was implemented to achieve fast parasite clearance.

Analysis of microvascular cerebral blood flow. Microvascular cerebral blood flow was evaluated using a laser speckle contrast imaging system (LSCI) (Perimed, Jarfalla, Sweden). LSCI provides a perfusion index proportional to the concentration and mean velocity of red blood cells. This methodology allows to quantify cortical blood flow changes with excellent spatial and temporal resolution^{60,61}. On day 6 post-infection animals with rectal temperature range between 31 and 36 °C were anesthetized with urethane (Sigma, USA) 2 mg/g i.p.. Mice had their scalp retracted and the skull exposed and were positioned under a LSCI light with a 785 nm wavelength. The body temperature of animals was kept at 36 °C using a thermostatic heating pad (Harvard Apparatus). The distance between the laser light source and the skull was 10 cm as recommended by the manufacturer. To assess the microvascular cerebral blood flow in real time, a region of interest (ROI) was defined, covering almost the entire area available for imaging, and the same ROI was used for all the animals used in the study. For the short-term (1 h) assessments, measurements of cerebral blood flow were performed before (baseline) and after the intervention (treatment) continuously for 60 minutes. In case of longer term (3 h and 6 h) assessments, different groups of mice were used for each timepoint. Analysis of six laser speckle images per second and relative cerebral blood flow of all animals were acquired using Perisoft software (Perimed, Jarfalla, Sweden) and expressed as arbitrary perfusion units (APU).

Brain eicosanoids extraction and determination of their concentrations by Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA). PbA-infected animals with ECM and PbNK65-infected mice were subjected to euthanasia and had their brains harvested on day 6 post-infection. Similarly, groups of mice with ECM treated with Ozagrel 100 mg/kg or saline had their brains harvested one hour after the treatment. Brains from uninfected mice were used as control. The samples were immediately flash frozen in liquid nitrogen and stored at

−70 °C until processed. For eicosanoids determination, the brain was thawed, weighed and then homogenized on ice with 1 mL of homogenization buffer [0.1 M sodium phosphate, pH 7.4, containing 1 mM of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) and 10 μM indomethacin] using a tissue grinder (Corning). Samples were centrifuged at 20,000 g for 30 min at 4 °C. The resulting supernatant (approximately 700 μL) was collected and mixed with the same volume of ethyl acetate (Vetec) and acetonitrile (Vetec) mixture (1:1) and then vortexed for 45 seconds. Samples were centrifuged again at 10,000 g for 15 min at 4 °C. The resulting organic phase was collected, dried using a speed vacuum (model iss110, Savant) for 3 hours and frozen at −70 °C. On the day of the assay, the dry samples were resuspended in 500 μL of enzyme immunoassay (EIA) buffer and the levels of TXB₂, 8-isoprostanes and PGE₂ were measured using EIA kits from Cayman Chemical and the levels of 20-HETE and 14,15-DHET were measured using ELISA kits from Detroit R&D, according to the manufacturers' instructions.

Blood-brain barrier permeability (Evans blue dye) assay. Animals with ECM were treated with artesunate (32 mg/kg i.p.) and either saline s.c., L-arginine (50 mg/kg s.c.) or Ozagrel (100 mg/kg s.c.). Five hours later animals were anesthetized with urethane (2 mg/g i.p.) and injected intravenously through orbital sinus with 150 μL of a 2% solution of Evans blue dye (Sigma) in PBS 1 ×. The dye was allowed to circulate for 1 hour and then the mice were transcardially perfused with ice-cold saline (10 mL) through the left ventricle. Animals were euthanized by decapitation, the brain was harvested, weighed and then incubated in 3 mL of formalide (Sigma) for 48 hours at 37 °C. The amount of Evans blue dye in the formalide solution was measured in a spectrophotometer at a wavelength of 620 nm.

Statistical analyses. All statistical analyses were performed using a statistical software package (Prism 7.0, GraphPad). To analyze parasitemia, body temperature and basal cerebral blood flow measurements a two-tailed unpaired t-test was used. Student t-test with Mann-Whitney correction and two-way ANOVA were used for analysis of cerebral blood flow before and after interventions. One-way ANOVA and Student t-test with Mann-Whitney correction were used for ELISA and Evans blue dye assay data analysis. Data are presented as mean ± standard deviation, except in the case of percentual changes in blood flow, where median and interquartile ranges (IQR) were used. P < 0.05 was considered statistically significant.

References

- Desruisseaux, M. S., Machado, F. S., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B. & Golightly, L. M. Cerebral malaria: a vasculopathy. *Am J Pathol.* **176**(3), 1075–1078 (2010).
- Ponsford, M. J. *et al.* Sequestration and microvascular congestion are associated with coma in human cerebral malaria. *J Infect Dis.* **205**(4), 663–71 (2012).
- Beare, N. A., Harding, S. P., Taylor, T. E., Lewallen, S. & Molyneux, M. E. Perfusion abnormalities in children with cerebral malaria and malarial retinopathy. *J Infect Dis.* **199**(2), 263–271 (2009).
- Maude, R. J. *et al.* The eye in cerebral malaria: what can it teach us? *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **103**(7), 661–4 (2009).
- Carvalho, L. J., Moreira, A. S., Daniel-Ribeiro, C. T. & Martins, Y. C. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* **109**(5), 577–88 (2014).
- Anstey, N. M. *et al.* Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med.* **184**(2), 557–67 (1996).
- Yeo, T. W. *et al.* Decreased endothelial nitric oxide bioavailability, impaired microvascular function, and increased tissue oxygen consumption in children with falciparum malaria. *J Infect Dis.* **210**(10), 1627–32 (2014).
- Rubach, M. P. *et al.* Impaired systemic tetrahydrobiopterin bioavailability and increased oxidized bipterins in pediatric falciparum malaria: association with disease severity. *PLoS Pathog.* **11**(3), e1004655 (2015).
- Alkaiat, M. S. *et al.* Decreased Rate of Plasma Arginine Appearance in Murine Malaria May Explain Hypoargininemia in Children with Cerebral Malaria. *J Infect Dis.* **214**(12), 1840–1849 (2016).
- Rubach, M. P. *et al.* Kinetic and Cross-Sectional Studies on the Genesis of Hypoargininemia in Severe Pediatric Plasmodium falciparum Malaria. *Infect Immun.* **87**(4), e00655–18 (2019).
- Weinberg, J. B. *et al.* Dimethylarginines: endogenous inhibitors of nitric oxide synthesis in children with falciparum malaria. *J Infect Dis.* **210**(6), 913–22 (2014).
- Chertow, J. H. *et al.* Plasmodium infection is associated with impaired hepatic dimethylarginine dimethylaminohydrolase activity and disruption of nitric oxide synthase inhibitor/substrate homeostasis. *PLoS Pathog.* **11**(9), e1005119 (2015).
- Yeo, T. W. *et al.* Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med.* **204**(11), 2693–704 (2007).
- Yeo, T. W. *et al.* Safety profile of L-arginine infusion in moderately severe falciparum malaria. *PLoS One.* **3**(6), e2347 (2008a).
- Yeo, T. W. *et al.* A randomized pilot study of L-arginine infusion in severe falciparum malaria: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics. *PLoS One.* **8**(7), e69587 (2013).
- Gramaglia, I. *et al.* Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med.* **12**(12), 1417–1422 (2006).
- Cabrales, P., Zanini, G. M., Meays, D., Frangos, J. A. & Carvalho, L. J. Nitric oxide protection against murine cerebral malaria is associated with improved cerebral microcirculatory physiology. *J Infect Dis.* **203**(10), 1454–1463 (2011).
- Penet, M. F. *et al.* Imaging experimental cerebral malaria *in vivo*: significant role of ischemic brain edema. *J Neurosci.* **25**(32), 7352–8 (2005).
- Cabrales, P., Zanini, G. M., Meays, D., Frangos, J. A. & Carvalho, L. J. Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am J Pathol.* **176**(3), 1306–1315 (2010).
- Martins, Y. C. *et al.* Slow and continuous delivery of a low dose of nimodipine improves survival and electrocardiogram parameters in rescue therapy of mice with experimental cerebral malaria. *Malar J.* **12**, 138 (2013).
- Orjuela-Sanchez, P. *et al.* Transdermal glyceryl trinitrate as an effective adjunctive treatment with artemether for late-stage experimental cerebral malaria. *Antimicrob Agents Chemother.* **57**, 5462–71 (2013).
- Ong, P. K. *et al.* Nitric oxide synthase dysfunction contributes to impaired cerebroarteriolar reactivity in experimental cerebral malaria. *PLoS Path.* **9**, e1003444 (2013).
- Ong, P. K., Moreira, A. S., Daniel-Ribeiro, C. T., Frangos, J. A. & Carvalho, L. J. M. Reversal of cerebrovascular constriction in experimental cerebral malaria by L-arginine. *Sci Rep.* **8**(1), 15957 (2018).
- Attwell, D. *et al.* Glial and neuronal control of brain blood flow. *Nature* **468**(7321), 232–243 (2010).
- Filosa, J. A. & Iddings, J. A. Astrocyte regulation of cerebral vascular tone. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **305**(5), H609–H619 (2013).
- Rink, C. & Khanna, S. Significance of brain tissue oxygenation and the arachidonic acid cascade in stroke. *Antioxid Redox Signal.* **14**(10), 1889–903 (2011).

27. Adibhatla, R. M. & Hatcher, J. F. Lipid oxidation and peroxidation in CNS health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. *Antioxid Redox Signal*. **12**, 125–169 (2010).
28. Perkins, D. J., Kremser, P. G. & Weinberg, J. B. Inverse relationship of plasma prostaglandin E2 and blood Mononuclear cell cyclooxygenase-2 with disease severity in children with Plasmodium falciparum malaria. *J Infect Dis*. **183**(1), 113–8 (2001).
29. Keller, C. C. *et al.* Reduced peripheral PGE2 biosynthesis in Plasmodium falciparum malaria occurs through hemozoin-induced suppression of blood mononuclear cell cyclooxygenase-2 gene expression via an interleukin-10-independent mechanism. *Mol Med*. **10**(1–6), 45–54 (2004).
30. Xiao, L., Patterson, P. S., Yang, C. & Lal, A. A. Role of eicosanoids in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *Am J Trop Med Hyg*. **60**(4), 668–673 (1999).
31. Ball, H. J., MacDougall, H. G., McGregor, I. S. & Hunt, N. H. Cyclooxygenase-2 in the pathogenesis of murine cerebral malaria. *J Infect Dis*. **189**(4), 751–758 (2004).
32. Cabrales, P. *et al.* Cerebral tissue oxygenation impairment during experimental cerebral malaria. *Virulence* **4**(3), 686–697 (2013).
33. Looareesuwan, S. *et al.* Magnetic resonance imaging of the brain in patients with cerebral malaria. *Clin Infect Dis*. **21**(2), 300–9 (1995).
34. Harawa, V. *et al.* Brain swelling is independent of peripheral plasma cytokine levels in Malawian children with cerebral malaria. *Malar J*. **17**(1), 435 (2018).
35. Kampondeni, S. D. *et al.* Noninvasive measures of brain edema predict outcome in pediatric cerebral malaria. *Surg Neurol Int*. **9**, 53 (2018).
36. Thumwood, C. M., Hunt, N. H., Clark, I. A. & Cowden, W. B. Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology*. **96**(Pt3), 579–89 (1988).
37. Yeo, T. W. *et al.* Recovery of endothelial function in severe falciparum malaria: relationship with improvement in plasma L-arginine and blood lactate concentrations. *J Infect Dis*. **198**(4), 602–8 (2008b).
38. Iadecola, C. & Nedergaard, M. Glial regulation of the cerebral microvasculature. *Nat Neurosci*. **10**(11), 1369–1376 (2007).
39. Petzold, G. C. & Murthy, V. N. Role of astrocytes in neurovascular coupling. *Neuron* **71**(5), 782–97 (2011).
40. Machado, F. S. *et al.* Endothelin in a murine model of cerebral malaria. *Exp Biol Med (Maywood)* **231**(6), 1176–81 (2006).
41. Clark, I. A. Thromboxane may be important in the organ damage and hypotension of malaria. *Med Hypotheses*. **7**(5), 625–631 (1981).
42. Surowiec, I. *et al.* The oxylinin and endocannabinoidome responses in acute phase Plasmodium falciparum malaria in children. *Malar J Sep* **16**(1), 358 (2017).
43. Waldman, M., Peterson, S. J., Arad, M. & Hochhauser, E. The role of 20-HETE in cardiovascular diseases and its risk factors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **125**, 108–17 (2016).
44. Miyamoto, A., Hashiguchi, Y., Obi, T., Ishiguro, S. & Nishio, A. Ibuprofen or ozagrel increases NO release and l-nitro arginine induces TXA₂ release from cultured porcine basilar arterial endothelial cells. *Vascular Pharmacology* **46**(2), 85–90 (2007).
45. Horváth, B. *et al.* Hypersensitivity to thromboxane receptor mediated cerebral vasomotion and CBF oscillations during acute NO-deficiency in rats. *PLoS One* **5**(12), e14477 (2010).
46. Assaraf, Y. G. *et al.* Cytostatic effect of DL- α -difluoromethylornithine against plasmodium falciparum and its reversal by diamines and spermidine. *Parasitol Res* **73**(4), 313–318 (1987).
47. Somani, R. R., Rai, P. R. & Kandpile, P. S. Ornithine Decarboxylase Inhibition: A Strategy to Combat Various Diseases. *Mini Rev Med Chem* **18**(12), 1008–1021 (2018).
48. Roberts, L. J. & Morrow, J. D. Isoprostanes. Novel markers of endogenous lipid peroxidation and potential mediators of oxidant injury. *Ann N Y Acad Sci*. **744**, 237–42 (1994).
49. Morrow, J. D. The isoprostanes – unique products of arachidonate peroxidation: their role as mediators of oxidant stress. *Curr Pharm Des*. **12**(8), 895–902 (2006).
50. Hamzah, J. *et al.* Retinol supplementation in murine Plasmodium berghei malaria: effects on tissue levels, parasitaemia and lipid peroxidation. *Int J Parasitol*. **37**(5), 525–537 (2007).
51. Charunwatthana, P. *et al.* N-acetylcysteine as adjunctive treatment in severe malaria: a randomized, double-blinded placebo-controlled clinical trial. *Crit Care Med*. **37**(2), 516–522 (2009).
52. Plewes, K. *et al.* Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe falciparum malaria: an observational study. *BMC Infect Dis*. **17**(1), 313 (2017).
53. Takahashi, K. *et al.* Glomerular actions of a free radical generated novel prostaglandin, 8-epi-prostaglandin F2 alpha, in the rat. Evidence for interaction with thromboxane A2 receptors. *J Clin Invest*. **90**(1), 136–41 (1992).
54. Hoffman, S. W., Moore, S. & Ellis, E. F. Isoprostanes: Free Radical-Generated Prostaglandins With Constrictor Effects on Cerebral Arterioles. *Stroke* **28**(4), 844–849 (1997).
55. Janssen, L. J. Isoprostanes: an overview and putative roles in pulmonary pathophysiology. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. **280**(6), L1067–L1082 (2001).
56. Braut, S. *et al.* Selective neuromicrovascular endothelial cell death by 8-Iso-prostaglandin F2alpha: possible role in ischemic brain injury. *Stroke* **34**(3), 776–782 (2003).
57. Imig, J. D., Simpkins, A. N., Renic, M. & Harder, D. R. Cytochrome P450 eicosanoids and cerebral vascular function. *Expert Rev Mol Med*. **13**, e7 (2011).
58. Nelson, J. W. *et al.* Role of soluble epoxide hydrolase in age-related vascular cognitive decline. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. **113–115**, 30–7 (2014).
59. Clemmer, L., Martins, Y. C., Zanini, G. M., Frangos, J. A. & Carvalho, L. J. Artemether and artesunate show the highest efficacies in rescuing mice with late-stage cerebral malaria and rapidly decrease leukocyte accumulation in the brain. *Antimicrob Agents Chemother*. **55**(4), 1383–1390 (2011).
60. Dunn, A. K. Laser speckle contrast imaging of cerebral blood flow. *Ann Biomed Eng*. **40**(2), 367–377 (2012).
61. Senarathna, J., Rege, A., Li, N. & Thakor, N. V. Laser Speckle Contrast Imaging: theory, instrumentation and applications. *IEEE Rev Biomed Eng*. **6**, 99–110 (2013).

Acknowledgements

This study was supported by ‘Cientista do Nosso Estado’ (CNE, Faperj) and ‘Universal’ (CNPq) grants to LJMC, and was developed in collaboration in the framework of the Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM). ASM is recipient of a CNPq doctorate fellowship, GSS is recipient of a CNPq scientific initiation fellowship, LJMC and CTDR are recipients of CNPq productivity and Faperj CNE fellowships.

Author Contributions

A.S.M. performed the experiments, participated in the study design, data analysis and interpretation and helped writing the manuscript; V.E. participated in the LSCI experiments; D.C.M. participated in the tissue processing and ELISA measurements of AA metabolites; G.S.S. and F.G. helped with the infections, tissue processing and permeability studies; E.T. and C.T.D.R. gave support and provided expertise in the infection and LCSI measurements; L.J.M.C. conceived the study, participated in the study design, data analysis and interpretation and wrote the manuscript; all authors reviewed the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Reversal of cerebrovascular constriction in experimental cerebral malaria by L-arginine

Peng Kai Ong¹, Aline S. Moreira², Cláudio T. Daniel-Ribeiro², John A. Frangos¹ & Leonardo J. M. Carvalho^{1,2}

Received: 9 May 2018
Accepted: 8 October 2018
Published online: 29 October 2018

Vascular dysfunction associated with low nitric oxide (NO) bioavailability and low plasma L-arginine levels is observed in both human and experimental cerebral malaria (ECM). In ECM, cerebrovascular constriction results in decreased pial blood flow and hypoxia, and administration of NO donors reverses constriction and increases survival. Supplementation of L-arginine, the substrate for NO synthesis by NO synthases, has been considered as a strategy to improve vascular health and act as adjunctive therapy in human severe malaria. We investigated the effect of L-arginine supplementation on pial vascular tonus of mice with ECM after direct superfusion on the brain surface or systemic delivery. Pial arteriolar diameters of *Plasmodium berghei*-infected mice with implanted cranial windows were measured using intravital microscopy methods, before and after L-arginine administration. Systemic delivery of L-arginine was performed intravenously, at 10, 50, 100 and 200 mg/kg, as bolus injection or slowly through osmotic pumps, combined or not with artesunate. Direct superfusion of L-arginine (10^{-7} M, 10^{-5} M and 10^{-3} M) on the brain surface of mice with ECM resulted in immediate, consistent and dose-dependent dilation of pial arterioles. ECM mice showed marked cerebrovascular constriction that progressively worsened over a 24 h-period after subcutaneous saline bolus administration. L-arginine administration prevented the worsening in pial constriction at all the doses tested, and at 50 mg/kg and 100 mg/kg it induced temporary reversal of vasoconstriction. Slow, continuous delivery of L-arginine by osmotic pumps, or combined bolus administration of artesunate with L-arginine, also prevented worsening of pial constriction and resulted in improved survival of mice with ECM. L-arginine ameliorates pial vasoconstriction in mice with ECM.

L-arginine is an essential amino acid substrate required for the enzymatic production of nitric oxide (NO) by NO synthase (NOS) and its deficiency can impair the NO synthesizing machinery¹. NO, being a physiologically important signaling molecule ubiquitously expressed in biological systems, can exert profound effects on the regulation of vascular function including blood shear stress-mediated smooth muscle relaxation and vasomotor tone, endothelial adhesion molecule expression, as well as platelet activation and aggregation². Hypoargininemia, a condition described by L-arginine deficiency, is a common pathological hallmark shared by both human cerebral malaria (CM) and murine/experimental CM (ECM)³⁻⁶, and has been associated with a high rate of CM case-fatality³. The mechanisms behind hypoargininemia are poorly understood, but recent studies have shown that plasma L-arginine depletion is driven primarily by a decreased rate of L-arginine, citrulline and ornithine appearance, and decreased conversion of citrulline to L-arginine⁵. Both hypoargininemia and low NO bioavailability have been intimately linked to the pathogenesis of CM^{3,7} and ECM⁴, which is characterized by a state of cerebrovascular dysfunction depicted by vasoconstriction, impaired vasodilation, inflammatory cells (e.g. leukocytes and platelets) adherence, endothelial damage, vascular leakage, haemorrhages, acidosis and hypoxia⁸⁻¹⁰. L-arginine supplementation aimed at restoring NOS production of NO appeared to be capable of ameliorating endothelial dysfunction in severe malaria^{11,12}, and could thus be potentially applied as adjunctive therapy for CM/ECM treatment¹³. It may also be possible that L-arginine supplementation can be beneficial to cerebrovascular health by enhancing blood rheological properties in microvessels, for instance, through improving flow deformability of red cells infected by the malarial parasites¹⁴.

¹La Jolla Bioengineering Institute, La Jolla, CA, USA. ²Laboratory of Malaria Research, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.J.M.C. (email: leojmc@ioc.fiocruz.br)

The correlation between an adjunctive therapy involving L-arginine aimed at restoring vascular health and its efficacy of treating CM in patients appeared unclear. Following initial promising results^{11,12}, a clinical trial failed to demonstrate a benefit of L-arginine in severe malaria despite safety of the treatment¹⁵. That study however did suggest an inadequacy of the L-arginine dosage administered, and recommended increasing the L-arginine dosage to achieve the desirable pharmacological effects of improving lactate clearance, restoring endothelial functionality and enhancing treatment efficacy. Pharmacokinetics studies of L-arginine administration in patients with moderately severe malaria have been performed¹⁶ and a pharmacokinetic-pharmacodynamic model has been developed¹⁷, and indicated that recovery of endothelial function might increase with increased infusion duration, and the percent time achieving therapeutic response increases with increasing L-arginine dose. In these studies, reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry (RH-PAT) index was used as a validated measure of endothelial function and organ perfusion, and showed high variability in the malaria patients. In the case of CM patients, acquiring an understanding of the L-arginine pharmacodynamics in terms of its cerebrovascular effects in response to different dosing regimens would be necessary to ensure optimal delivery of this pharmacological agent in eliciting the desired outcome with maximal potency. In the mouse model, preventative L-arginine administration did not significantly decrease the incidence of ECM^{5,18} and high doses actually resulted in decreased survival¹⁹. It should be cautioned that these studies did not verify whether those administered schemes and dosages exerted an effect on resuscitating the impaired cerebrovascular response in ECM. In other words, without an assessment of cerebrovascular function in the murine brain, it remained elusive whether various modes of systemic L-arginine administration (bolus/continuous delivery) or various dosage strengths tested are capable of delivering pharmacologically effective amount of this agent to the brain to restore impaired cerebrovascular reactivity and possibly avert the fate of ECM development. The above should be further emphasized since exogenous sources of L-arginine supplementation would be inevitably susceptible to systemic degradation in the presence of intense *in vivo* inflammation associated with the malarial infection²⁰. In addition, and importantly, the above-described treatment regimes refer to ECM-preventative strategies; the effect of L-arginine administration as adjunctive therapy in mice with established ECM in combination with antimalarial drugs has not been shown.

A cranial window superfusion method enabled local delivery of test compounds to the highly delicate brain tissue of living mice with ECM²¹, leading to the discovery that mice with ECM show impaired endothelial and neuronal NOS (eNOS and nNOS)-mediated cerebrovascular dilatory responses, which were partially restored by tetrahydrobiopterin (BH4) superfusion²². In the present study, this approach was used to deliver L-arginine to the brain in order to assess the cerebrovascular reactivity to L-arginine so that systemic intravascular sources of L-arginine degradation under an ECM setting can be minimized. In addition, by adopting a classical closed cranial window model for visualization and monitoring of the cerebrovasculature during a treatment regime, we seek to develop an understanding on how cerebrovascular reactivity in ECM mice could be influenced by different systemic routes and regimes of L-arginine administration. In particular, we monitored reactivity of arterioles in terms of their diameter change since these small resistive vessels can react dynamically to the application of vasoactive agents which is critical to cerebral blood flow regulation. When an L-arginine delivery scheme that can produce a significant beneficial effect on cerebrovascular tone (e.g. based on reversing vasoconstriction by the greatest extent) in ECM was available, we further investigated whether this effect was sustainable when applied in an adjunctive therapy setting with the anti-malarial drug, artesunate. Our findings demonstrated a dose-dependent effect of L-arginine exposure on the recovery of impaired cerebrovascular reactivity upon direct delivery to the brain tissue, however with variable responses following systemic administration, in combination or not with artesunate treatment.

Results

Parasitemia, motor score and temperature. ECM mice that were used in the experiments were hypothermic, with rectal temperatures ranging between 32 °C and 36 °C (uninfected controls: 39.1 ± 0.5 °C). They also presented decreased motor scores (10 ± 1.1; uninfected controls: 22.0 ± 0.6). At the time of ECM, mice showed mean parasitemia of 13.9 ± 3.6%.

Pial arteriolar diameter responses to L-arginine superfusion. Control experiments were performed in uninfected mice to examine their pial arteriolar reactivity to the superfusion of L-arginine. As shown in Fig. 1A, arteriolar diameters were relatively unchanged from their baseline over a range of L-arginine concentrations tested (10⁻⁵M to 10⁻³M), implying that L-arginine supplementation (direct delivery at the brain surface) has minimal effect on arteriolar vasomotor tone in healthy mice.

The pial arterioles of mice with ECM (day 6 of infection) were suffused with increasing concentration of L-arginine (from 10⁻⁷M to 10⁻⁵M to 10⁻³M), with a superfusion duration of 30 minutes for each concentration to ensure steady state arteriolar diameters were obtained before the next higher concentration of L-arginine was delivered. A dose-dependent increase in arteriolar diameter from baseline was observed as L-arginine concentration increased from 10⁻⁷M to 10⁻⁵M and then to 10⁻³M (Fig. 1B). Although our approach of cranial window preparation for superfusion in this study did not permit us to assess the healthy baseline (prior to infection) diameters of arterioles in mice that developed ECM, previous studies^{9,23} applying the classical closed cranial window for monitoring of the brain vasculature during ECM had revealed a vasoconstrictory state of arterioles from healthy baseline levels. This observation coupled with our present findings thus suggested that L-arginine treatment may be capable of reversing or attenuating the vasoconstrictory profile in ECM.

Pial arteriolar diameter responses to intravenous infusion of L-arginine. It would be of interest to evaluate if systemic introduction of L-arginine via the intravenous pathway is capable of reversing the pial arteriolar vasoconstriction in ECM mice, producing effects similar to those seen with cranial window superfusion.

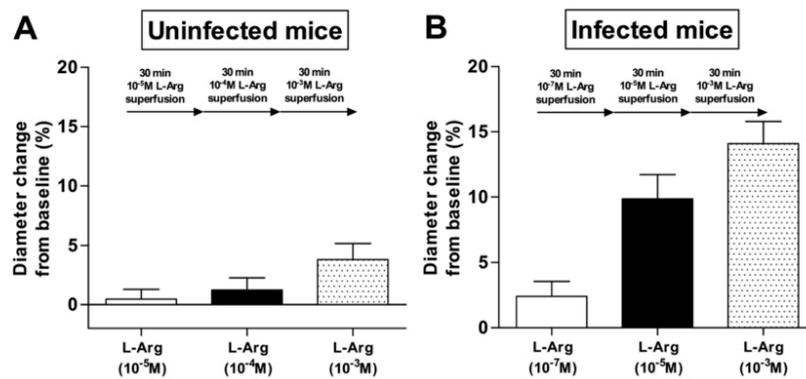


Figure 1. Pial arteriolar diameter responses to L-arginine superfusion in uninfected (A) and infected (B) mice. L-arginine was introduced in incremental concentration (10^{-5} , 10^{-4} and 10^{-3} M for uninfected mice and 10^{-7} , 10^{-5} , 10^{-3} M for ECM mice), with a superfusion duration of 30 min for each concentration. Four mice were investigated in each group. Total number of arterioles examined are 24 and 17 in (A,B), respectively. Diameter changes are presented as a percentage of pre-treatment baseline. L-arginine superfusion at 10^{-5} and 10^{-3} M induced significant ($p < 0.05$) increases in arteriolar diameters in ECM mice (B).

First, we looked at the pharmacodynamics response of L-arginine in terms of vessel diameter change from pre-treatment levels (relative to day 0 healthy baseline diameters), at various time points (15 min, 1 h, 3 h, 6 h and 24 h) on day 6 of infection. ECM mice treated with saline were used as control. As shown in Fig. 2A–E, substantial arteriolar constriction (between -21% and -35% from day 0 baseline) was generally found in mice with ECM before L-arginine treatment. Arterioles of ECM mice treated with saline not only remained constricted throughout the study period, but actually vasoconstriction worsened at the late time points of 3 h, 6 h and 24 h (going from a mean 22% constriction at pre-treatment to a mean 37% at 3 h and 35% at 6 h). On the other hand, L-arginine treatment, at all dosages, was capable of preventing the aggravation in vasoconstriction at the time points of 3 h and 6 h. Moreover, at the doses of 50 mg/kg and 100 mg/kg, L-arginine was actually capable of ameliorating vasoconstriction, promoting dilation at the 3 h time point (in the case of 50 mg/kg, constriction went from a mean 21% at pre-treatment to a mean 8% at 3 h). At the 24 h time point, constriction worsened in most groups. Responses of individual vessels were variable. For instance, in the case of animals treated with L-arginine at 50 mg/kg, at the 3 h time point, out of 30 arterioles analyzed, 16 dilated, 8 remained relatively stable and 6 showed further constriction in relation to baseline. This response profile was in marked contrast with that observed in ECM mice treated with saline. In this case, at the 3 h time point, out of 14 arterioles analyzed, none dilated, 4 remained relatively stable and 10 showed further and mostly severe constriction. In uninfected mice, L-arginine treatment did not significantly affect vessel diameter at all dosage strengths (Fig. 2F).

As shown, just by comparing vessel diameter changes in relation to their own respective pre-treatment values, the effect of L-arginine treatment seemed rather small. However, when L-arginine treatment at each dose was compared with the saline control in the corresponding time points, a marked effect was evident (Fig. 3). This was true whether the response of individual vessels (Fig. 3A: 10 mg/kg: $p = 0.0097$; 50 mg/kg: $p = 0.0018$; 100 mg/kg: $p = 0.0001$; 200 mg/kg: $p < 0.0001$) or individual animals (Fig. 3B: 10 mg/kg: not significant, $p = 0.1072$; 50 mg/kg: $p = 0.0435$; 100 mg/kg: $p = 0.01$; 200 mg/kg: $p < 0.0186$) was accounted for. All four doses proved to be beneficial at the 1 h, 3 h and 6 h timepoints. In terms of magnitude, while an aggravation of vasoconstriction in the order of 16% at 3 hours occurred after saline bolus administration, in ECM mice receiving 50 or 100 mg/kg of L-arginine a vasodilation in the order of 15–21% was observed. There was no significant differences in the responses to the doses of 50, 100 and 200 mg/kg, but each of these three doses induced a stronger response than the 10 mg/kg dose.

Pial arteriolar diameter responses to continuous subcutaneous delivery of L-arginine. Small infusion osmotic pumps were implanted subcutaneously on day 6 of infection to provide slow and continuous L-arginine dosing (50 mg/kg/day) of ECM mice over a time period of 24 h. Pial arteriolar diameter changes were monitored at various time points: 15 min, 1 h, 3 h, 6 h and 24 h post treatment. L-arginine treatment of healthy mice served as controls. Interestingly, continuous L-arginine delivery in healthy mice led to vasoconstriction particularly at 3 h and 6 h after treatment. This effect was found to subside with time (Fig. 4A). In mice with ECM, continuous infusion of saline resulted in aggravation of vasoconstriction (Fig. 4B). On the other hand, continuous L-arginine treatment prevented the aggravation in vasoconstriction, and even promoted vasodilation at the 1 h time point, an effect that subsided thereafter (Fig. 4C). Again, compared with saline, continuous L-arginine administration resulted in improved vascular responses (Fig. 4D, $p = 0.007$).

Pial arteriolar diameter responses to L-arginine combined with artesunate. Our results above revealed that systemic administration of L-arginine at 50, 100 and 200 mg/kg bolus injection intravenously

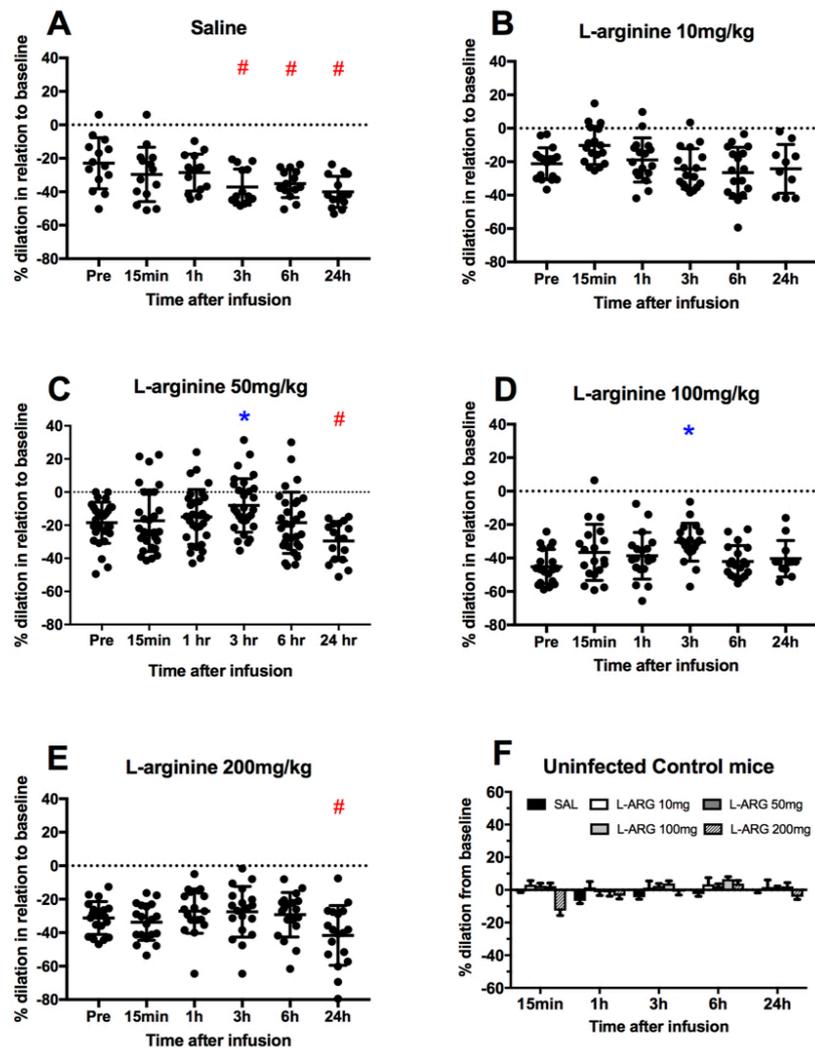


Figure 2. (A–E) Pial arteriolar diameter responses to L-arginine treatment, given intravenously as a bolus injection, in ECM mice. Each graph represent the responses to different dosages: (A) none (saline); (B) 10 mg/kg; (C) 50 mg/kg; (D) 100 mg/kg; (E) 200 mg/kg. Four mice were investigated in each dosage group. Each circle represents an individual arteriole (total number per group varied between 14 and 30). Diameter changes are presented relative (%) to their healthy baseline at day 0 prior to infection (dotted line). An asterisk (*) represents a significant increase ($p < 0.05$) in diameter in relation to time zero (“Pre”), whereas a hashtag (#) represents a significant decrease ($p < 0.05$) in diameter. (F) Pial arteriolar diameter responses to L-arginine treatment, given intravenously as a bolus injection, in uninfected control mice. The bars represent the mean \pm standard deviation of % diameter change of each group (saline or L-arginine 10, 50, 100 and 200 mg/kg) relative to pre-treatment.

produced the more pronounced effects on reversing the vasoconstriction in ECM mice. Therefore, it would be of interest to evaluate if this beneficial effect on vasomotor tone in ECM mice can be maintained following implementation of an adjunctive therapy approach combining the above L-arginine delivery scheme with artesunate administrated via i.p. ECM mice treated with saline plus artesunate served as control. As shown in Fig. 5, results were similar to those observed when saline or L-arginine were given without artesunate (Fig. 2). Saline together

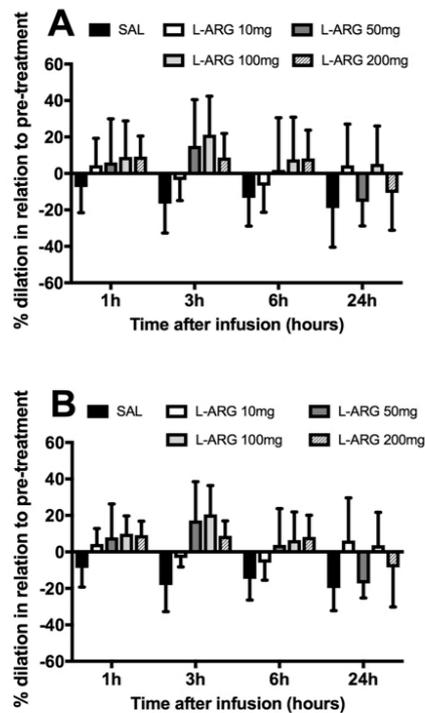


Figure 3. Pial arteriolar diameter responses to L-arginine treatment, given intravenously as a bolus injection, in ECM mice. The bars represent the mean \pm standard deviation of % diameter change of each group (saline or L-arginine 10, 50, 100 and 200 mg/kg), in this case relative to pre-treatment (baseline defined as the arteriolar diameters of mice with ECM on day 6, just before treatment). (A) Mean \pm standard deviation of % diameter change of individual vessels. (B) Mean \pm standard deviation of % diameter change of individual animals (vessel diameter changes averaged per animal). ECM mice that received saline showed aggravation of vasoconstriction over time (1 h, 3 h, 6 h and 24 h). L-arginine prevented the aggravation of vasoconstriction (at all doses) and even resulted in dilation (doses of 50, 100 and 200 mg/kg). The changes in diameter were significantly different from the saline group for all doses at the timepoints of 1 h, 3 h and 6 h (A) (10 mg/kg: $p = 0.0097$; 50 mg/kg: $p = 0.0018$; 100 mg/kg: $p = 0.0001$; 200 mg/kg: $p < 0.0001$) and for all doses except 10 mg/kg in (B) (10 mg/kg: $p = 0.1072$; 50 mg/kg: $p = 0.0435$; 100 mg/kg: $p = 0.01$; 200 mg/kg: $p < 0.0186$).

with artesunate failed to demonstrate any reversal in the vasoconstrictory state of ECM mice throughout the observation period (24 h). In fact, pial arterioles became progressively more constricted from pre-treatment (-21.5%) levels, reaching a maximal constriction (-42.3%) at the 6 h time point. In the case of mice with ECM treated with the adjunctive therapy scheme combining L-arginine with artesunate, no aggravation in vasoconstriction was observed (Fig. 5B). A substantial improvement in vascular responses is evidenced when L-arginine versus saline treatments were compared at each timepoint (Fig. 5C, $p = 0.0102$).

Survival outcomes of mice treated with L-arginine combined with artesunate. Groups of mice presenting ECM were treated with artesunate (32 mg/kg) combined with either L-arginine (50 mg/kg) or saline. Adjuvant therapy with L-arginine resulted in improved survival (68.6% versus 49.0% in the group of mice treated with artesunate plus saline) (Fig. 6, $p = 0.047$).

Discussion

L-arginine is a common substrate involved in the regulation of multiple physiological processes. As a precursor of NO production, it is essential for the maintenance of vascular health. In many human pathologies, for instance malaria infection, a state of L-arginine deficiency or hypoarginemia can exist which limits NO production³. Underlying causes have been attributed to a plethora of factors such as an increase in enzymatic arginase expression and activation by products of hemolysis and inflammatory reactions^{24,25} as well as inadequate renal L-arginine adsorption or endogenous biosynthesis or recycling³. More recently, Alkaiat and coworkers showed that increased arginase activity or impaired protein catabolism do not explain the low plasma L-arginine levels

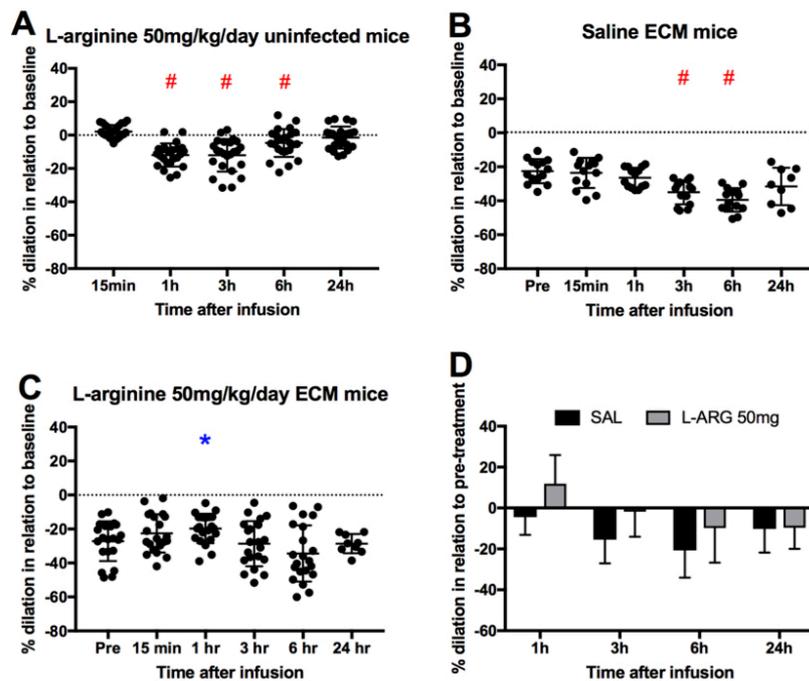


Figure 4. (A–C) Pial arteriolar diameter responses to slow continuous delivery of L-arginine (50 mg/kg/day) given subcutaneously using osmotic pumps, in uninfected (A) and ECM mice receiving saline (B) or L-arginine (C). Three to four mice were investigated in each group (A: 24 arterioles, B: 14 arterioles, C: 21 arterioles). For uninfected healthy mice, diameter changes are presented with respect to their pre-treatment levels, whereas for infected ECM mice diameter changes are presented with respect to their healthy baseline at day 0 prior to infection. One mouse died in group C after timepoint 6 hours. An asterisk (*) represents a significant increase ($p < 0.05$) in diameter in relation to time zero, whereas a hashtag (#) represents a significant decrease ($p < 0.05$) in diameter in relation to time zero. (D) Mean \pm standard deviation of % diameter change of each group (saline or L-arginine 50 mg/kg/h), in this case relative to pre-treatment (baseline defined as the arteriolar diameters of mice with ECM on day 6, just before treatment). The changes in diameter in the L-arginine group were significantly different from the saline group at the timepoints of 1 h, 3 h and 6 h ($p = 0.007$).

in severe malaria. Instead, decreased L-arginine and citrulline appearance seemed to be primarily responsible for plasma L-arginine and citrulline depletion⁵. A lack of L-arginine abrogates NO production in the brain which in turn can adversely compromise cerebrovascular function. A possible mechanism is the uncoupling of enzymes synthesizing NO, the NO synthases (NOS), which can trigger a vicious cycle of exacerbated oxidative stress (e.g. superoxides and peroxynitrite release) and diminished NO production. We have previously demonstrated that both eNOS and nNOS are dysfunctional in ECM, leading to impaired pial arteriolar reactivity to acetylcholine and N-methyl-D-aspartate (NMDA) stimuli, and shown that the dysfunction can be linked to cofactor BH4 depletion and associated with elevated oxidative stress and NOS uncoupling²². These findings, a priori, might suggest a complex picture with multiple factors causing or impacting NOS dysfunction. The remarkable finding of the present study is the demonstration that replenishment of the NOS substrate L-arginine directly to pial vessels causes per se immediate and sustained dose-dependent dilation of constricted arterioles. This finding suggests that a major reason for cerebrovascular dysfunction in ECM can be ascribed to L-arginine deficiency, indicating that otherwise the NOS enzymes are functional even at an environment of oxidative stress and BH4 deficiency, and therefore giving support to the prospect that a relatively simple intervention, that is, L-arginine supplementation, could restore cerebrovascular function in cerebral malaria, as proposed¹¹.

This proof of principle is highly relevant, however potential therapies to restore cerebrovascular function in cerebral malaria will not be delivered directly to brain vessels and will have to deal with systemic delivery and all its limitations, including targeting, pharmacokinetics, metabolism, degradation (e.g., oxidation), etc. In human malaria, systemic infusion of L-arginine have shown mixed outcomes. Earlier studies with L-arginine infusion in patients with severe or moderately severe malaria indicated that this intervention was safe and induced

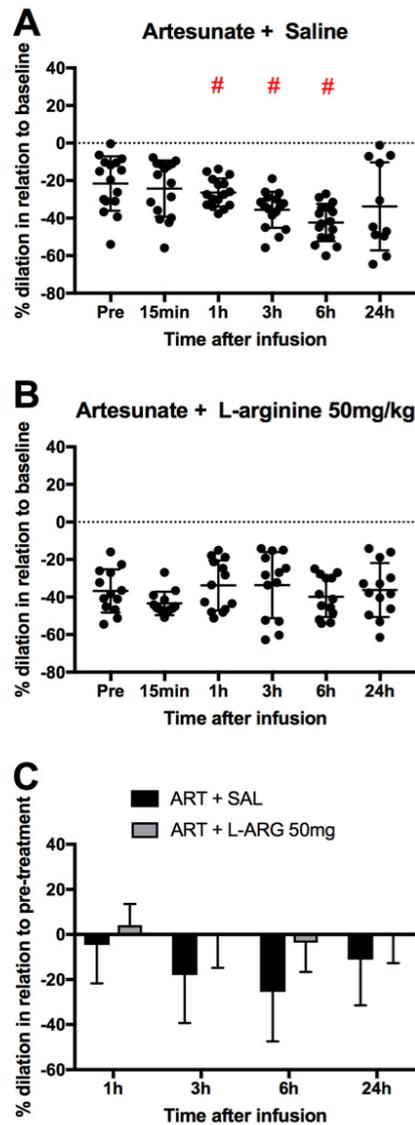


Figure 5. Pial arteriolar diameter responses to combinative therapy of (A) saline plus artesunate 32 mg/kg and (B) L-arginine 50 mg/kg plus artesunate 32 mg/kg in ECM. Saline and L-arginine were intravenously administered as a bolus injection. Three mice were investigated in each group (A: 16 arterioles, B: 13 arterioles). One mouse died in group A after timepoint 6 hours. An asterisk (*) represents a significant increase ($p < 0.05$) in diameter in relation to time zero, whereas a hashtag (#) represents a significant decrease ($p < 0.05$) in diameter in relation to time zero. (C) Mean \pm standard deviation of % diameter change of each group (saline or L-arginine 50 mg/kg), in this case relative to pre-treatment (baseline defined as the arteriolar diameters of mice with ECM on day 6, just before treatment). The changes in diameter in the L-arginine group were significantly different from the saline group at the timepoints of 1 h, 3 h and 6 h ($p = 0.0102$).

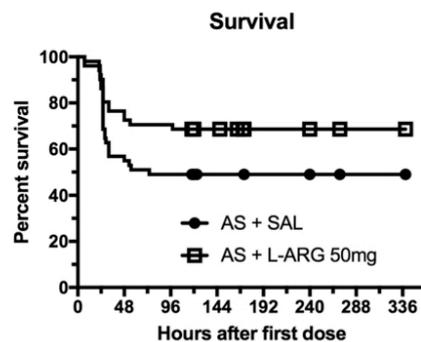


Figure 6. Survival outcomes of mice with ECM treated with artesunate 32 mg/kg (5 doses daily) and either L-arginine 50 mg/kg (AS + L-ARG, n = 51) or saline (AS + SAL, n = 51). Results shown are the combination of four different experiments. Survival was 68.6% in the group that received L-arginine versus 49.0% in the group that received saline ($p = 0.047$).

improvement in NO bioavailability (measured by exhaled NO levels) and vascular function (measured by reactive hyperemia-peripheral arterial tonometry (RH-PAT)^{11,12}. However, in another study with severe malaria patients infusion of L-arginine did not improve lactate clearance or endothelial NO bioavailability¹⁵. Simulations of dosing schedules using a pharmacokinetic-pharmacodynamic model predicted that increasing the L-arginine dose and using regimens of continuous infusion over longer periods would result in improved efficacy¹⁷.

In animal models of stroke, intravenous L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation and increases regional cerebral blood flow^{26,27}. The mouse model provides us with the opportunity to look at the effect of systemic L-arginine supplementation directly on the brain vasculature, which is highly relevant for its expected and presumptive effects in cerebral malaria. The doses chosen (10, 50, 100 and 200 mg/kg) were similar to those used in human studies (the three higher doses equivalent to 3 g, 6 g and 12 g in patients weighing about 60 kg), which showed the existence of a positive correlation between the extent of endothelial function recovery or NO production and ascending doses of L-arginine used for treating patients with moderately severe malaria¹¹. In the present study, mice with ECM that received saline, with or without artesunate, showed progressive constriction of pial arterioles over the observation period (24 h), confirming our previous observations with saline-treated or artemether-treated mice²³. On the other hand, the progression in the intensity of vasoconstriction was halted when L-arginine was given to mice with ECM, with or without artesunate. In addition, at certain doses (especially 50 and 100 mg/kg), L-arginine administration even resulted in transient reversal of vasoconstriction. In terms of magnitude, while an aggravation of vasoconstriction in the order of 16% at 3 hours occurred after saline bolus administration, in ECM mice receiving 50 or 100 mg/kg of L-arginine a vasodilation in the order of 15–21% was observed. This effect, although with some variation in magnitude, was seen whether L-arginine was administered as a bolus, at slow continuous rate or in combination with artesunate. These data provide proof of principle that systemic delivery of L-arginine can partially restore cerebrovascular responses in cerebral malaria. At the dosage used, a continuous subcutaneous delivery system was attempted, but the effect was not better than that observed with the bolus strategy. However, in the case of this continuous, slow delivery system, a dose-dependent response still needs to be established, as reported with nimodipine and glyceryl trinitrate^{23,28}. In severe malaria patients, no significant effect of L-arginine treatment given as slow infusion (1.5 g/hr over 8 hrs) on lactate clearance and NO production was observed¹⁵. The lack of pharmacological response of L-arginine treatment was attributed to the low concentration of L-arginine administered coupled with greater severity of the disease condition, such that the biologically available quantity of L-arginine may not be pharmacologically effective which otherwise highlighted the need for a higher dosage regime to demonstrate efficacy. Also, in the human studies of L-arginine infusion in malaria patients, there was some concern of decreases in bicarbonate and pH due to the hydrogen and chloride ion components of the L-arginine hydrochloride, the only formulation available for human use^{15,29}. The present study was performed with a pure, non-hydrochloride-containing, L-arginine, which may have resulted in improved responses.

Data from moderately severe malaria patients indicates that increasing the L-arginine dose coupled with infusion regimens over longer periods may improve the vascular effects of L-arginine¹⁷. In animal studies, a much higher dose (1,500 mg/kg) resulted in exacerbation of cerebral malaria, with earlier mortality¹⁹. However, in that case, L-arginine was given as a preventative treatment, before or just after starting the infection, and therefore it is not comparable to this study design. In similar preventative treatment studies with lower doses of L-arginine, the exacerbation of the disease was not observed¹⁸.

In the present study, although the outcome in terms of vascular diameters showed marked improvement in L-arginine-treated as compared to saline-treated ECM mice, L-arginine either as monotherapy or combined with artesunate showed variable responses, reversing constriction or inducing dilation in most but not all vessels or animals. Further studies are necessary to understand the factors involved in these variable responses and optimize the benefit of L-arginine supplementation on cerebrovascular health.

When comparing saline-treated versus L-arginine-treated ECM mice, the beneficial effects on vascular diameters peaked at 3 hours and persisted at 6 hours. Alternative treatment protocols might be taken into consideration, for instance with the inclusion of additional doses to ensure even more prolonged and sustained responses. However, even a temporary amelioration of cerebrovascular responses might possess tremendous impact in patient recovery, as it would help to maintain brain function and life at the most critical period, the time window between the patient's admission and before the antimalarial drug effectively kill the parasites, buying the patient a precious few hours. This interpretation is strengthened by the finding that L-arginine supplementation in combination with artesunate resulted in improved survival in relation to mice treated with artesunate combined with saline. Therefore, despite the limitations of systemic delivery, L-arginine not only helped restoring cerebrovascular function but had a benefit on survival, which is the critical outcome for any adjunctive therapy.

L-arginine supplementation has been tested or considered in a number of pathological conditions such as angina pectoris, congestive heart failure, erectile dysfunction, sickle cell disease and others. Its potential for treating chronic conditions, however, has been challenged by reports of "L-arginine tolerance", as its benefits on vascular function were not seen after long term exposure^{30,31}. *In vitro* studies showed that longer term exposure to L-arginine was actually detrimental instead of beneficial to vascular health, by suppressing endothelial NOS activity and intensifying oxidative stress levels³². However, in acute situations such as cerebral malaria, L-arginine will be administered during a short time window lasting hours or a few days, between admission/start of treatment and recovery from coma, and therefore this type of tolerance is not expected to occur.

Overall, the present study provides evidence and proof of principle that L-arginine supplementation is capable of partially reversing cerebrovascular constriction in experimental cerebral malaria, or at least prevent its worsening after antimalarial treatment is initiated. However, while topical superfusion produces consistent dilatory responses in pial vessels, systemic intravenous infusion results in variable and dose-dependent responses. Further studies are necessary to optimize the systemic delivery schemes that result in more consistent and sustained vascular responses. The definition of such optimized schemes could provide critical information for such optimization also in human severe malaria L-arginine-based therapies.

Materials and Methods

Infection of mice. All protocols were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations and were approved by the La Jolla Bioengineering and FioCruz Institutional Animal Care and Use committees. Eight-to-ten-week-old female C57BL/6 mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) were intraperitoneally (i.p.) inoculated with 10^6 *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) parasites expressing the green fluorescent protein (PbA-GFP, a donation from the Malaria Research and Reference Reagent Resource Center - MR4, Manassas, VA; deposited by CJ Janse and AP Waters; MR4 number: MRA-865).

Clinical parameters. To measure the parasitemia, a small blood sample (~1 μ l) was obtained by a mouse tail end prick, and flow cytometry was used to detect and count the number of parasitized RBCs that expresses GFP in relation to 10,000 RBCs. For rectal temperature measurement, a thermocouple probe (Oakton® Acorn™; Oakton Instruments, IL, USA) was used. Motor behavioral score was determined by a composite scoring system based on six motor behavior tests modified from the SHIRPA protocol³³. ECM was defined as the presentation of one or more of the following clinical signs of neurological involvement: ataxia, limb paralysis, poor righting reflex, seizures, roll-over and coma.

Window preparation for cranial superfusion. A cranial window preparation scheme with improved stability to deliver test compounds to the brain of ECM mice was adopted here²¹. Briefly, highly invasive surgical procedures (skin removal and skull drilling) typically involved in a craniotomy were performed beforehand in the healthy animal to create a skull bone flap prior to infection of the animal to induce ECM. At the time of experimentation, the bone flap can be readily retracted and a prefabricated perfusion chamber can be assembled to enable superfusion of its exposed brain cortical surface. This approach minimizes mechanical trauma exerted on the delicate brain tissue of the sick animal during window preparation for study. The same window preparation procedures were applied to the healthy uninfected mice that serve as control in all superfusion experiments.

Closed window preparation for chronic imaging of vessel diameter. The classical closed cranial window preparation, as previously described^{34,35}, was utilized for monitoring long term changes in pial arteriolar diameters. This type of window preparation, unlike the window for cranial superfusion, does not allow direct topical delivery of test compounds to the brain cortex and therefore, test agents will have to be delivered systemically. In the present study, test agents were delivered via the intravenous or subcutaneous pathway. On the other hand, this type of window preparation allows repeated measurements to be performed at the same site in the cerebrovasculature, and therefore, it is advantageous for prolonged monitoring of the same vessel throughout the course of the disease genesis. By utilizing this approach, we are able to monitor changes in vessel diameter of the same arteriole from pre-infection to ECM development and then from pre-treatment to post-treatment with L-arginine delivered systemically.

Intravital microscopy and vessel diameter quantification. Mice implanted with cranial window (superfusion/closed type), were mildly anesthetized with isoflurane and transferred onto an intravital microscope stage (customized Leica-McBain, San Diego, CA). Randomly chosen pial arterioles ($N = 2-6$ per mouse; baseline vessel diameters = 35 to 115 μ m) distinguished by their diverging flow pattern at bifurcating points throughout the vasculature, were visualized by epi-illumination using a 20 \times water immersion objective lens, and their diameters measured using an Image Shear device (0.213 μ m/pixel; Vista Electronics, San Diego, CA).

L-arginine superfusion procedures. Both uninfected healthy and infected ECM mice, implanted with cranial windows for superfusion, were subjected to the L-arginine superfusion protocol. Accordingly, pial arterioles were visualized through the cranial window using intravital microscopy, and changes in diameter were recorded after superfusion with L-arginine. L-arginine was introduced in sequence of increasing concentration (10^{-7} M to 10^{-3} M) with a superfusion duration of 30 mins for each concentration which ensured that steady state vessel diameter was achieved before the next concentration was delivered.

L-arginine systemic treatment procedures. Two weeks after surgery, baseline diameter of pial arterioles in uninfected mice with implanted closed cranial windows were acquired. Spatial coordinates or visual landmarks allowing repeated easy tracking of the same vessel location were noted. Mice were then infected i.p. with PbA (10^6), and those that developed ECM (specifically, rectal temperatures between 32–36 °C) on day 6 of infection were subjected to intravital microscopy to obtain diameters of the same arterioles. Following which, mice were subjected to the treatment protocol and vessel diameters were again acquired at multiple time points (0, 3, 6, and 24 hr) after treatment. Treatments were introduced systemically in two ways, either as a bolus injection through the mouse tail vein or through continuous delivery via the subcutaneous pathway using Alzet osmotic pumps (see description below). For each administration pathway, mice were treated with L-arginine (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, USA) or saline (as control). L-arginine was also combined with artesunate (Sigma, St Louis, MO, USA, 32 mg/kg/day) injected i.p. to assess the effect of this combined therapy on pial arteriolar diameter response. L-arginine was dissolved in saline whereas artesunate was dissolved in 5% sodium bicarbonate in saline. Another group of mice, correspondingly treated with saline plus artesunate, served as control. Study for each treatment group lasted for 24 hours, after which the mice were euthanized with a cocktail of sodium pentobarbital at 390 mg plus sodium phenytoin at 50 mg/ml (Euthasol; 100 mg/kg, i.p.).

Continuous L-arginine delivery via osmotic pumps. To achieve continuous delivery of pharmacological agent systemically, osmotic pumps (Alzet, Cupertino, CA) were implanted subcutaneously in healthy/ECM mice. Osmotic pumps (model 1003D, constant delivery rate of 1 μ L/hour for up to 3 days) were filled with the appropriate solution (42 mg/mL of L-arginine to target a delivery of 50 mg/kg/day of L-arginine or saline as control – 100 μ L final volume) and primed in 0.9% sterile saline at 37 °C for approximately 4 hours to ensure immediate delivery of the contents after implantation. Mice with ECM (day 6 of infection) were anesthetized using isoflurane and the primed pumps were implanted subcutaneously in the back, slightly posterior to the scapulae, under sterile conditions.

Survival experiments. These experiments were designed to determine whether L-arginine had a beneficial effect when given as adjunctive therapy in combination with artesunate in mice with ECM, as previously described^{9,23}. Development of cerebral malaria was assessed by clinical evaluation of neurological signs such as ataxia, convulsions, limb paralysis and/or coma. Rectal temperature was used as the objective criterion for treatment, as mice with cerebral malaria develop hypothermia. Mice presenting rectal temperature in the range of 32–36 °C were randomly assigned to two groups: 1) treated with artesunate 32 mg/kg in 5% bicarbonate solution (intraperitoneal) plus L-arginine 50 mg/kg in saline (subcutaneously); 2) treated with artesunate 32 mg/kg in 5% bicarbonate solution (intraperitoneal) plus L-saline (subcutaneously). All mice received artesunate once daily for 5 days. L-arginine or saline were given in two doses, at time zero and 24 hours after first dose. Mice were followed up for 7 days after the last dose and then euthanized with overdose of pentobarbital.

Statistical analyses. All statistical analyses were performed using a statistical software package (Prism 7, Graphpad). To compare three or more experimental groups in terms of temperature, motor score and parasitemia, a one-way ANOVA test with Bonferroni post hoc analysis was applied. To determine the effect of treatment on arteriolar diameter response in ECM mice, arteriolar diameter change relative to day 0 healthy baseline was compared between pre-treatment and post-treatment (intra-group) at individual time points (15 mins, 1 hr, 3 hr, 6 hr or 24 hr) using two-tailed paired t-test. A two-way ANOVA was performed to determine the effect of treatment (each L-arginine dose) and time (1 hr, 3 hr and 6 hr–24 hr was not analyzed as some of the mice died) in relation to the control saline group. Analyses were performed considering either the individual vessels or the individual animals (in which case the responses of individual vessels of each animal were averaged). All reported data were in mean \pm SD. Survival curves were analyzed with Log-rank test. $P < 0.05$ was considered statistically significant.

References

1. Boger, R. H. The pharmacodynamics of L-arginine. *Altern Ther Health Med* **20**(3), 48–54 (2014).
2. Cooke, J. P. The pivotal role of nitric oxide for vascular health. *Can J Cardiol*, **20** Suppl B, 7B–15B (2004).
3. Lopansri, B. K. *et al.* Low plasma arginine concentrations in children with cerebral malaria and decreased nitric oxide production. *Lancet* **361**, 676–8 (2003).
4. Gramaglia, I. *et al.* Low nitric oxide bioavailability contributes to the genesis of experimental cerebral malaria. *Nat Med* **12**, 1417–22 (2006).
5. Alkhatib, M. S. *et al.* Decreased rate of plasma arginine appearance in murine malaria may explain hypoargininemia in children with cerebral malaria. *J Infect Dis* **214**(12), 1840–1849 (2016).
6. Gupta, S. *et al.* Extensive alterations of blood metabolites in pediatric cerebral malaria. *PLoS One*, **12**(4), e0175686 (2017).
7. Anstey, N. M. *et al.* Nitric oxide in Tanzanian children with malaria: inverse relationship between malaria severity and nitric oxide production/nitric oxide synthase type 2 expression. *J Exp Med* **184**(2), 557–67 (1996).
8. Cabrales, P. *et al.* Cerebral tissue oxygenation impairment during experimental cerebral malaria. *Virulence* **4**, 686–97 (2013).
9. Cabrales, P. *et al.* Murine cerebral malaria is associated with a vasospasm-like microcirculatory dysfunction, and survival upon rescue treatment is markedly increased by nimodipine. *Am J Pathol* **176**, 1306–15 (2010).
10. Carvalho, L. J., Moreira, A. S., Daniel-Ribeiro, C. T. & Martins, Y. C. Vascular dysfunction as a target for adjuvant therapy in cerebral malaria. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **109**(5), 577–88 (2014).
11. Yeo, T. W. *et al.* Impaired nitric oxide bioavailability and L-arginine reversible endothelial dysfunction in adults with falciparum malaria. *J Exp Med* **204**, 2693–704 (2007).

12. Yeo, T. W. *et al.* Recovery of endothelial function in severe falciparum malaria: relationship with improvement in plasma L-arginine and blood lactate concentrations. *J Infect Dis* **198**, 602–8 (2008).
13. John, C. C. *et al.* Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of *Plasmodium falciparum* malaria. *Exp Rev Anti-infect Ther* **8**, 997–1008 (2010).
14. Rey, J. *et al.* Reduced erythrocyte deformability associated with hypoargininemia during *Plasmodium falciparum* malaria. *Sci Rep* **4**, 3767 (2014).
15. Yeo, T. W. *et al.* A randomized pilot study of L-arginine infusion in severe falciparum malaria: preliminary safety, efficacy and pharmacokinetics. *PLoS One* **8**, e69587 (2013).
16. Yeo, T. W. *et al.* Pharmacokinetics of L-arginine in adults with moderately severe malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 4381–4387 (2008).
17. Brussee, J. M. *et al.* Pharmacokinetic-pharmacodynamic model for the effect of L-arginine on endothelial function in patients with moderately severe falciparum malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **60**(1), 198–205 (2015).
18. Martins, Y. C. *et al.* Efficacy of different nitric oxide-based strategies in preventing experimental cerebral malaria by *Plasmodium berghei* ANKA. *PLoS One* **7**, e32048 (2012).
19. Xu, H. *et al.* L-arginine exacerbates experimental cerebral malaria by enhancing pro-inflammatory responses. *Tohoku J Exp Med* **236**(1), 21–31 (2015).
20. Wijnands, K. A. *et al.* Arginine and citrulline and the immune response in sepsis. *Nutrients* **7**, 1426–63 (2015).
21. Ong, P. K. *et al.* A chronic scheme of cranial window preparation to study pial vascular reactivity in murine cerebral malaria. *Microcirculation* **20**, 394–404 (2013).
22. Ong, P. K. *et al.* Nitric oxide synthase dysfunction contributes to impaired cerebroarteriolar reactivity in experimental cerebral malaria. *PLoS Path* **9**, e1003444 (2013).
23. Orjuela-Sanchez, P. *et al.* Transdermal glyceryl trinitrate as an effective adjunctive treatment with artemether for late-stage experimental cerebral malaria. *Antimicrob Agents Chemother* **57**, 5462–71 (2013).
24. Munder, M. *et al.* Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **163**, 3771–7 (1999).
25. Omodeo-Sale, F. *et al.* Dysregulation of L-arginine metabolism and bioavailability associated to free plasma heme. *American journal of physiology. Cell Physiol* **299**, C148–54 (2010).
26. Morikawa, E., Rosenblatt, S. & Moskowitz, M. A. L-arginine dilates rat pial arterioles by nitric oxide-dependent mechanisms and increases blood flow during focal cerebral ischaemia. *Br J Pharmacol* **107**(4), 905–7 (1992).
27. Morikawa, E. *et al.* L-arginine infusion promotes nitric oxide-dependent vasodilation, increases regional cerebral blood flow, and reduces infarction volume in the rat. *Stroke* **25**(2), 429–35 (1994).
28. Martins, Y. C. *et al.* Slow and continuous delivery of a low dose of nimodipine improves survival and electrocardiogram parameters in rescue therapy of mice with experimental cerebral malaria. *Malar J* **12**, 138 (2013).
29. Yeo, T. W. *et al.* Safety profile of L-arginine infusion in moderately severe falciparum malaria. *PLoS One* **3**(6), e2347 (2008).
30. Wilson, A. M. *et al.* L-arginine supplementation in peripheral arterial disease: no benefit and possible harm. *Circulation* **116**(2), 188–195 (2007).
31. Schulman, S. P. *et al.* L-arginine therapy in acute myocardial infarction: the vascular interaction with age in myocardial infarction (VINTAGE MI) randomized clinical trial. *JAMA* **295**(1), 58–64 (2006).
32. Mohan, S. *et al.* Continuous exposure to L-arginine induces oxidative stress and physiological tolerance in cultured human endothelial cells. *Amino Acids* **43**, 1179–88 (2012).
33. Martins, Y. C. *et al.* Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *Int J Exp Pathol* **90**, 119–30 (2009).
34. Mostany, R. & Portera-Cailliau, C. A craniotomy surgery procedure for chronic brain imaging. *J Vis Exp* **12**, 680 (2008).
35. Cabrales, P. & Carvalho, L. J. Intravital microscopy of the mouse brain microcirculation using a closed cranial window. *J Vis Exp* **45**, 2184 (2010).

Acknowledgements

This study was supported by National Institutes of Health Grants R01-HL87290 and R01-AI82610 (to LJMC), and MERIT R37-HL40696 (to JAF), by CNPq Grant 422430/2016-1 (LJMC) and was developed in collaboration in the framework of the Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM). ASM is recipient of a CNPq fellowship, and LJMC and CTDR are recipients of ‘Cientista do Nosso Estado’ (Faperj) and productivity (CNPq) fellowships.

Author Contributions

P.K.O. performed the experiments, participated in the study design, data analysis and interpretation and wrote the manuscript; A.S.M. performed the survival experiments, and with C.T.D.R. reviewed the data and the manuscript; J.A.F. participated in the study design and data interpretation, and reviewed the manuscript; L.J.M.C. conceived the study, participated in the study design, data analysis and interpretation and wrote the manuscript.

Additional Information

Competing Interests: The authors declare no competing interests.

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2018