

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

TATHIANY IGREJA DA SILVA

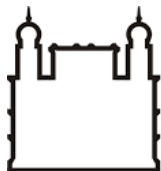
PAPEL DA EXCITOTOXICIDADE NEURONAL NO DESENVOLVIMENTO DA
MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL E SUAS SEQUELAS

Orientador: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

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

Rio de Janeiro

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

TATHIANY IGREJA DA SILVA

**PAPEL DA EXCITOTOXICIDADE NEURONAL NO DESENVOLVIMENTO
DA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL E SUAS SEQUELAS**

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

Orientador: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto
Co-orientador (a): Dr.^a Patrícia Alves Reis

Rio de Janeiro
2021

IGREJA DA SILVA, TATHIANY.

PAPEL DA EXCITOTOXICIDADE NEURONAL NO DESENVOLVIMENTO DA MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL E SUAS SEQUELAS / TATHIANY IGREJA DA SILVA. - Rio de Janeiro, 2021.

100 f.; il.

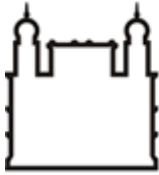
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

Orientador: HUGO CAIRE DE CASTRO FARIA NETO.

Co-orientadora: PATRÍCIA ALVES REIS.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Malária. 2. Malária Cerebral. 3. Excitotoxicidade Neuronal. 4. Dano Cognitivo. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

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

AUTOR: TATHIANY IGREJA DA SILVA

**PAPEL DA EXCITOTOXICIDADE NEURONAL NO DESENVOLVIMENTO DA
MALÁRIA CEREBRAL EXPERIMENTAL E SUAS SEQUELAS**

Orientador: Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto

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

Aprovada em: 21/10/2021

BANCA EXAMINADORA:

Dr. Daniel Pedra Adesse – IOC – FIOCRUZ/RJ

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

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

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus por não me deixar esmorecer diante dos desafios encontrados, me dando forças e determinação durante a trajetória para a conclusão de mais uma etapa do meu crescimento acadêmico.

Agradeço aos meus orientadores o Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto e a Dr.^a Patrícia Alves Reis pela orientação e paciência. Ao Dr. Hugo Caire de Castro Faria Neto, agradeço por me receber em seu laboratório e me dar a oportunidade de trabalhar na sua equipe de excelentes pesquisadores e, ainda, pelos ensinamentos adquiridos ao longo deste trabalho. À Dr.^a Patrícia Alves Reis, agradeço a dedicação, a compreensão, por ser solícita e paciente ao me instruir, por me incentivar e, principalmente, por sempre acreditar na minha capacidade de fazer um bom trabalho!

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

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

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

Aos meus colegas de equipe, Tamires da Cunha Fernandes, Millena Pais Lourenço e Júlia Maria Peixoto Loureiro pela amizade, pelos momentos de descontração e pelo apoio dentro e fora da bancada!

Aos demais amigos do laboratório de Imunofarmacologia pelo apoio e carinho!

Aos componentes da banca pela gentileza de aceitarem o convite!

E a todos que contribuíram de alguma forma para que essa tese fosse concluída com êxito.

RESUMO

Papel da excitotoxicidade neuronal no desenvolvimento da malária cerebral experimental e suas sequelas

Igreja da Silva, Tathiany

A malária ainda é uma doença infecciosa grave em todo o mundo. A malária cerebral (MC) é a pior complicação e ocorre principalmente na infecção por *Plasmodium falciparum*, caracterizada pelo sequestro de eritrócitos parasitados nos microvasos cerebrais e uma intensa resposta inflamatória. A fisiopatologia inclui ativação de células endoteliais e leucócitos, liberação de citocinas/quimiocinas pró-inflamatórias e aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS), que levam à quebra da barreira hematoencefálica e à perturbação do sistema nervoso central. Várias neuropatias estão associadas a alterações na concentração de neurotransmissores. Glutamato é o principal neurotransmissor envolvido na excitotoxicidade neuronal. A ativação excessiva dos receptores NMDA, especialmente os receptores extrassinápticos, aumenta os níveis intracelulares do íon Ca^{+2} e interfere na homeostase das transmissões sinápticas, desregulando as vias de sobrevivência neuronal e ativando as vias de morte celular, o que contribui para o desenvolvimento do déficit cognitivo. O objetivo deste trabalho foi estudar os eventos associados à excitotoxicidade neuronal durante a patogênese da malária cerebral experimental. Camundongos C57BL/6 machos foram inoculados com *P. berghei* ANKA (PbA, CEUA L025/2015). Nos primeiros sintomas de MC, grupos de animais foram tratados com memantina (10 mg/kg v.o.), inibidor farmacológico de receptores NMDA extrassinápticos, ou 7-nitroindazol (25 mg/kg v.ip.), inibidor seletivo de nNOS. A análise cognitiva foi realizada por testes de memória aversiva e espacial após a recuperação da infecção pelo tratamento antimalárico com cloroquina (25 mg/kg v.o.). Tratamento adjuvante com memantina ou 7-nitroindazol reverteu a disfunção cognitiva observada nos camundongos infectados. Ambos os tratamentos foram capazes de reduzir os níveis teciduais de IFN- γ e TNF- α em resposta à infecção, bem como diminuir a atividade de mieloperoxidase e a expressão de GluN2B, nNOS, 3-nitrotirosina e 4-hidroxynonenal. Além disso, os tratamentos restauraram o nível normalizado de expressão da proteína pós-sináptica PSD-95, desregulada durante a infecção por PbA. A redução da expressão de caspases 3, 8 e 9 também foi observada. A excitotoxicidade pode estar associada ao declínio cognitivo decorrente da MC e tratamentos capazes de intervir na ativação da via têm efeito benéfico sobre a neuroinflamação e a disfunção cognitiva.

ABSTRACT

Role of the neuronal excitotoxicity in the development of the experimental cerebral malaria and its sequelae

Igreja da Silva, Tathiany

Malaria is still a serious infectious disease worldwide. Cerebral malaria (CM) is the worst complication and occurs mainly in *Plasmodium falciparum* infection. It is characterized by the sequestration of parasitized erythrocytes in the brain microvessels and an intense inflammatory response. The pathophysiology includes activation of endothelial cells and leukocytes, release of pro-inflammatory cytokines/chemokines and increase of reactive oxygen species (ROS), that lead to the breakdown of the blood-brain barrier and the disturbance of the central nervous system. Several neuropathies are associated with disturbances in neurotransmitter concentrations. Glutamate is the main neurotransmitter involved in the neuronal excitotoxicity. The excessive activation of NMDA receptors, especially extrasynaptic receptors, increases of the intracellular levels of the Ca^{+2} ion and interfere with the homeostasis of synaptic transmissions, deregulating neuronal survival pathways and activating the cell death pathways, which contributes to the development of cognitive impairment. The objective of this work was to study the events associated with the neuronal excitotoxicity during the pathogenesis of experimental cerebral malaria. C57BL/6 male mice were inoculated with *P. berghei* ANKA (PbA, CEUA L025/2015). At the first symptoms of CM, treatment with memantine (10 mg/kg p.o.), a pharmacological inhibitor of extrasynaptic NMDA receptors, or the 7-nitroindazole (25 mg/kg ip.), a selective nNOS inhibitor, was performed. The cognitive analysis was performed by aversive and spatial memory tests after the recovery of the infection after chloroquine antimalarial treatment (25 mg/kg p.o.). Adjuvant treatment with memantine or 7-nitroindazole reversed cognitive dysfunction observed in the PbA infected mice. Both treatments were able to reduce tissue levels of IFN- γ and TNF- α in response to infection, as well as to decrease the activity of myeloperoxidase and the expression of GluN2B, nNOS, 3-nitrotyrosine and 4-hydroxynonenal. In addition, treatments restored the normalized level of expression of pos-synaptic protein PSD-95, deregulated during PbA infection. The reduction of the expression of caspases 3, 8 and 9 was also observed. Excitotoxicity could be associated with cognitive decline due to CM and treatments capable to intervening in the activation of the pathway have beneficial effect on neuroinflammation and cognitive dysfunction.

Lista de Siglas e Abreviaturas:

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

HRP-2	- Proteína 2 rica em histidina (histidine rich-protein 2)
HOCL	- Ácido hipocloroso
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
ICAM-1	- Molécula de Adesão Intercelular 1 (<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>)
IFN-γ	- Interferon gama
IL	- Interleucina
iNOS	- Óxido nítrico sintase induzível (<i>Inducible nitric oxide sintase</i>)
IP-10	- Proteína inflamatória-10 (<i>Inflammatory protein-10</i>)
LDH	- Desidrogenase láctica (<i>lactic dehydrogenase</i>)
LFA-1	- Antígeno 1 associado a função linfocitária (lymphocyte function-associated antigen-1)
LT	- Linfotoxinas
LTP	- Potenciação de longa duração (<i>long-term potenciacion</i>)
MCE	- Malária cerebral experimental
MDA	- Malondialdeído
MIP	- Proteína inflamatória macrofágica (<i>macrophage inflammatory protein</i>)
MIF	- Fator inibitório da migração do macrófago (<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>)
MPO	- Mieloperoxidase
MSP-1	- Proteína 1 da superfície do merozoíta (Merozoite surface protein 1)
NADPH-oxidase	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase (<i>nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase</i>)

NAD ⁺	- Nicotinamida adenina dinucleotídeo (<i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i>)
NMDA	- N-Methyl-D aspartate
NO	- Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NOS	- Óxido nítrico sintase (<i>Nitric oxide sintase</i>)
nNOS	- Óxido nítrico sintase neuronal (<i>Neuronal nitric oxide sintase</i>)
NRL	- Receptores NOD-like
OMS	- Organização Mundial de Saúde
ONOO ⁻	- Peroxinitrito
PAMP	- Padrões moleculares associados à patógeno (<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>)
PARP-1	- Poly [ADP-ribose] polymerase-1
PbA	- <i>Plasmodium berghei</i> ANKA
PfEMP-1	- Proteína 1 de membrana eritrocítica do <i>P. falciparum</i>
PF4	- Fator plaquetário 4 (<i>platelet factor 4</i>)
PK	- Proteína quinase (Protein kinase)
RBC	- Hemácias (<i>Red blood cell</i>)
RLR	- Receptores RIG-I-like
RNS	- Espécies reativas de nitrogênio (<i>Reactive nitrogen species</i>)
RON	- Rhoptry Neck proteins
ROS	- Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
RRP	- Receptores de reconhecimento padrão
RTD	- Diagnóstico de teste rápido (<i>rapid test diagnostic</i>)

SHIRPA	- SmithKline Beecham, Harwell, Imperial College and Royal London Hospital Phenotype Assessment
SNC	- Sistema Nervoso Central
SPECT	- Proteína do micronema do esporozoíta essencial a travessia (<i>sporozoite microneme protein essencial for transversal</i>)
TBARS	- Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (<i>thiobarbituric acid-reactive substances</i>)
TNF- α	- Fator de Necrose Tumoral α (<i>Tumor necrosis factor α</i>)
TSP	- Trombospondina
TRAP	- Proteína adesiva relacionada à trombospondina (<i>Trombospondin-related-adhesive protein</i>)
TRL	- Receptores semelhantes ao Toll (<i>Toll-like receptors</i>)
VCAM-1	- Molécula de adesão vascular-1 (<i>Vascular cell adhesion protein-1</i>)
VLA-1	- Antígeno 1 muito tardio (very late antigen-1)

Lista de Figuras:

Figura 1 - Áreas com ocorrência de malária no mundo.....	3
Figura 2 – Áreas com ocorrência de malária no Brasil.....	5
Figura 3 - Ciclo de vida do parasita da malária.....	9
Figura 4 – Via de sinalização glutamatérgica disparada no processo de formação e consolidação de memória.....	19
Figura 5 - Circuito nervoso hipocampal relacionado ao processo de formação e consolidação de memória.....	21
Figura 6 - Cepas de <i>Plasmodium sp.</i> que infectam diferentes linhagens de camundongos usadas em modelos murinos experimentais.....	28
Figura 7 - Avaliação de curva de mortalidade, parasitemia e escore clínico de camundongos C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> (PbA) tratados ou não com inibidor de NMDA extrassináptico (memantina) ou inibidor da enzima nNOS (7-nitroindazol)	40
Figura 8 – Avaliação do dano cognitivo em camundongos C57BL/6 infectados com <i>Plasmodium bherghei Anka</i> (PbA) tratados ou não com inibidor de NMDA extrassináptico (memantina) ou inibidor da enzima nNOS (7-nitroindazol)	42
Figura 9 - Avaliação da expressão de receptores NMDA extrassinápticos (GLUN2B) em camundongos infectados tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	43
Figura 10 - Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em camundongos infectados tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	44
Figura 11 - Avaliação da produção de TNF- α e IFN- γ no cérebro de camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol.....	45
Figura 12 - Avaliação da expressão de ERK 1/2 em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol.....	46
Figura 13 - Avaliação da expressão de GFAP e produção de S100 β em camundongos infectados tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	47
Figura 14 - Avaliação de estresse oxidativo no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	49

Figura 15 - Avaliação de mieloperoxidase (MPO) no tecido cerebral de camundongos tratados com memantina ou 7-nitroindazol após a infecção com <i>Plasmodium berghei ANKA</i>	50
Figura 16 - Avaliação da expressão de PSD-95 e sinaptofisina em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol.....	51
Figura 17 - Avaliação da ativação das vias intrínseca e extrínseca de apoptose em camundongos infectados com <i>Plasmodium berghei ANKA</i> tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol no 6º dia após a infecção.....	52

SUMÁRIO:

1. Introdução	1
1.1 Malária.....	1
1.1.1 Definição e Origem.....	1
1.1.2 Epidemiologia e Controle.....	3
1.1.3 Ciclo do parasita.....	8
1.1.4 Imunopatogênese da Malária.....	11
1.2 Malária Cerebral.....	13
1.2.1 Fisiopatologia.....	13
1.2.2 Disfunção cognitiva	17
1.2.2.1 Memória: Formação e consolidação.....	18
1.2.2.2 Mecanismos associados à disfunção cognitiva.....	21
1.2.2.2.1. Neuroinflamação.....	21
1.2.2.2.2 Excitotoxicidade Neuronal.....	23
1.2.2.2.2.1 Estresse oxi/nitrosativo e morte celular.....	25
1.3 Modelos Experimentais.....	26
1.4 Estratégias Terapêuticas.....	28
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo geral.....	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3. Metodologia	32
3.1 Animais.....	32
3.2 Manutenção e Infecção.....	32
3.3 Parasitemia e Sobrevida.....	32
3.4 Escore clínico de avaliação de gravidade da doença.....	33
3.5 Fármacos administrados.....	33
3.6 Testes Comportamentais.....	34
3.6.1 Freezing.....	34
3.6.2 Labirinto Aquático de Morris.....	34
3.7 Coleta de Amostras.....	35
3.7.1 Sangue.....	35
3.7.2 Cérebros.....	35
3.8 Análise de atividade de mieloperoxidase (MPO) cerebral.....	35
3.9 Dosagem de citocinas através do ensaio imunoabsorção ligado à Enzima (ELISA).....	36
3.10 Western Blotting.....	37
3.11 Análise estatística.....	38
4. Resultados	39

4.1 Avaliação do tratamento com memantina ou 7-nitroindazol em camundongos C57BL/6 no desenvolvimento da malária cerebral experimental (MCE).....	39
4.2 Avaliação de disfunção cognitiva em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	41
4.3 Avaliação da expressão de receptores NMDA extrassinápticos em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	43
4.4 Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	44
4.5 Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	45
4.6 Avaliação da ativação de ERK1/2 em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	46
4.7 Avaliação da astrogliose em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	47
4.8 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	48
4.9 Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	50
4.10 Avaliação da expressão de proteínas pré-sinápticas e pós-sinápticas em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	50
4.11 Avaliação de apoptose celular em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental.....	52
5. Discussão.....	54
6. Conclusão.....	65
7. Bibliografia.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 MALÁRIA

1.1.1 Definição e Origem

A malária é uma doença ocasionada pela infecção por protozoários do gênero *Plasmodium*, que são transmitidos ao hospedeiro através da picada da fêmea de mosquitos do gênero *Anopheles*. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a malária é considerada um grave problema de saúde pública e responde, atualmente, por cerca de 400 mil mortes a cada ano (OMS, 2020).

A origem da malária é incerta. A doença parece ter surgido na África, embora alguns registros antigos de outras civilizações já contivessem indícios da existência da doença (Cunha and Cunha, 2010). Os primeiros gregos observaram sintomas de febre e o aumento do baço encontrados em pessoas que viviam em regiões pantanosas (Cox *et al.*, 2010).

O termo malária surgiu no século XVIII, oriundo do italiano mal'aire (ar insalubre), a partir da difusão da idéia que a doença ocorria pelo ar emanado dos pântanos. Em 1880, o cirurgião do exército francês, Charles Louis Alfonse Laveran, foi o primeiro a descobrir o parasita causador da doença (Cox *et al.*, 2010, Cox *et al.*, 2017). Ele observou, no sangue de um paciente com febre de 15 dias, que elementos filiformes se moviam com grande vivacidade nas bordas de corpos esféricos pigmentados deslocando os glóbulos vermelhos vizinhos (CDC, Malaria, History, 2015). Nessa época, quase nada se sabia sobre o modo de transmissão da doença até que, em 1897, o médico britânico Ronald Ross descobriu que a doença era transmitida através da picada de mosquitos, a partir de observações da ocorrência de malária em pássaros após a picada de mosquitos culicídeos (Cox *et al.*, 2017). Com esses dados, Ross acreditava que a transmissão em humanos ocorria do mesmo modo. Porém, foi em meados de 1898 que isso foi demonstrado pelos malariologistas italianos Amico Bignami, Giuseppe Bastianelli e Giovanni Battista Grassi. Eles concluíram os estudos referentes à forma de transmissão humana, demonstrando de forma conclusiva que a ocorrência da malária humana é, de fato, decorrente da transmissão do parasita por mosquitos, sendo neste caso, mosquitos anofelinos (Cox *et al.*, 2010; Majori *et al.*, 2012; Cox *et al.*, 2017). O ciclo de vida completo do parasita,

no entanto, só foi desvendado em 1947, quando Henry Shortt e Cyril Garnham puderam demonstrar que o ciclo do parasita possuía duas fases: uma fase anterior ao estágio eritrocítico e que ocorria no fígado, a fase exoeritrocítica, e o estágio sanguíneo, a fase eritrocítica (Cox *et al.*, 2017).

Atualmente, a malária humana é descrita como uma infecção que pode ocorrer por seis diferentes espécies conhecidas: *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae*, 2 subespécies de *Plasmodium ovale* (*P. ovale curtsi* e *P. ovale wallikeri*) (Calderaro *et al.*, 2013) e *Plasmodium knowlesi*, um causador de malária zoonótica descoberto na Malásia e regiões do Sudeste Asiático (Zaw and Lin, 2019; OMS,2020). Entretanto, assim como o *P. knowlesi*, outras espécies têm demonstrado potencial de transmissão zoonótica e novos casos de malária humana têm surgido a partir de agentes como o *Plasmodium cynomolgi* na Ásia, o *Plasmodium brasilianum* e o *Plasmodium simium*, encontrados nas Américas (de Alvarenga *et al.*, 2015; de Alvarenga *et al.*, 2018).

Os sintomas clínicos da malária observados em, aproximadamente, 10 a 15 dias após a picada do vetor, são febre alta, calafrios, náuseas e/ou vômitos, dores de cabeça e dores no corpo (CDC, Malaria, Disease, 2020). Eventualmente, a malária pode evoluir para casos de maior gravidade. A síndrome da malária grave é definida pela presença do plasmódio no sangue, além da confirmação clínica e laboratorial de disfunção grave de órgãos vitais (Luzolo and Ngoyi,2019). As três principais manifestações clínicas observadas incluem anemia grave, dificuldades respiratórias e malária cerebral, sendo esta última associada a comprometimento neurológico (Rénia *et al.*, 2012; Luzolo and Ngoyi,2019). Outras manifestações como acidose metabólica, hipoglicemia, hipoargininemia e falha renal aguda também já foram documentadas (Luzolo and Ngoyi,2019).

O *Plasmodium falciparum* é a principal espécie relacionada aos casos graves (OMS, 2020; Schiess *et al.*, 2020). Contudo, o fenômeno de citoaderência, um evento clássico observado no desenvolvimento da malária complicada em infecções por *P. falciparum*, pode também ocorrer nas infecções por *P. vivax* e *P. knowlesi* (Craig *et al.*, 2012; Fatih *et al.*, 2012; Singh *et al.*, 2013). De fato, a ocorrência de malária cerebral decorrente da infecção por *Plasmodium vivax* já foi documentada (Gupta *et al.*,2016). Os eventos mais observados nos casos de gravidade associados a infecções por *Plasmodium não-falciparum* são anemia grave e complicações respiratórias (Cowman *et al.*, 2016; Moxon *et al.*, 2020).

1.1.2 Epidemiologia e Controle

A malária é uma das doenças de maior morbidade e mortalidade no mundo, portanto, uma das principais doenças parasitárias existentes. A cada ano, mais de 200 milhões de novos casos são notificados. Segundo a Organização Mundial de Saúde (2020), em 2019, foram estimados 229 milhões de casos e, de forma preocupante, essa estimativa praticamente não se alterou nos últimos 4 anos. Além disso, no mesmo ano, 409 mil vidas foram ceifadas.

Aproximadamente metade da população mundial está sob risco de contrair a doença, mas inúmeros esforços continuam sendo feitos em prol da redução de casos ao longo dos anos (OMS, 2020). A Figura 1 mostra, nos dias de hoje, a distribuição mundial de malária, destacando áreas de maior e menor incidência desde 2015. No mapa, podemos observar que a maior concentração dos casos de malária ocorre na região localizada entre os trópicos.

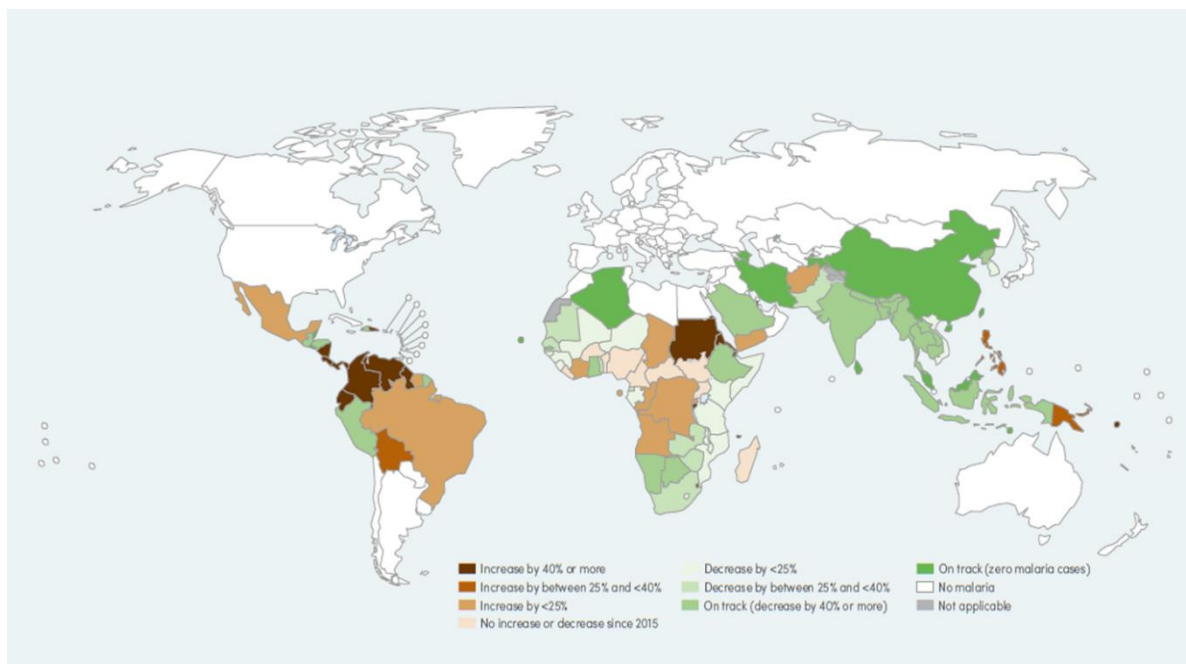


Figura 1. Áreas com ocorrência de malária no mundo. Distribuição dos casos de malária ao redor do mundo mostrando os países que sofreram aumento no número de casos observados e os países que reduziram a incidência de casos de 2015 até os dias atuais. (OMS, 2020).

A malária é uma doença típica de países pobres e clima tropical. As condições climáticas das áreas de risco são propícias ao desenvolvimento dos vetores. Além disso, a preferência de algumas espécies de *Anopheles* por se alimentar de humanos, sendo chamadas espécies antropofílicas, favorece a transmissão da malária na nossa espécie (Rossati *et al.*, 2016; Ashley *et al.*, 2018).

O continente africano continua sendo a principal área acometida, registrando a maioria de casos e mortes por malária. Os registros mostram que mais de 90% dos óbitos ocorrem na África devido a infecções causadas, principalmente, por *P. falciparum*. A África Subsaariana apresenta o maior número de vítimas, sendo em sua maioria mulheres grávidas, idosos, adultos imunossuprimidos e, principalmente, crianças abaixo dos 5 anos de idade (OMS, 2020). Em 2019, este último grupo respondeu por 67% das mortes decorrentes de malária no mundo. Apesar disso, regiões da Ásia, da América Latina, pequenas extensões do Oriente Médio e porções europeias também são afetadas (OMS, 2020).

Nas Américas, mais de 100 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. O *Plasmodium vivax* é o principal agente encontrado nas Américas, sendo responsável por 76% dos casos observados (OMS, 2020). Em 2019, 139 milhões estavam sob risco de contrair a doença. No mesmo período, 723 mil casos foram confirmados e, embora esse dado demonstre redução no panorama geral de número de casos em relação ao ano anterior, 8 países (Haiti, Nicarágua, Panamá, República Dominicana, Honduras, Costa Rica e Suriname) registraram aumento da incidência de casos (OMS, 2020).

Nas Américas, o Brasil é o segundo país com maior ocorrência de casos da doença e um dos componentes da tríade responsável por mais 80% dos casos estimados na região em 2019, junto com a Colômbia e a Venezuela. Segundo o relatório mais recente da OMS, o país responde por 20% da incidência dos casos de malária, somando infecções com *P. vivax*, *P. falciparum* e mistas (OMS, 2020). Apesar disso, em 2019, Brasil registrou 19,1% menos casos de malária em relação ao ano anterior, registrando 157.454 notificações da doença contra 194.572 no mesmo período em 2018 (OMS, 2020).

O Brasil apresenta grande parte da transmissão (99%) na Região Amazônica ou Amazônia Legal, composta pelos estados do Amazonas, Acre, Amapá, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins. A região extra-amazônica, composta pelos outros 17 estados e o Distrito Federal, é responsável por

apenas 1% do total de casos. As espécies de plasmódio encontradas no Brasil são *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae* (Boletim Epidemiológico, SVS/MS, 2020). O *P. vivax* é o de maior prevalência no país, registrando atualmente cerca de 80% dos casos. As infecções por *P. falciparum* estão em segundo lugar e correspondem aos 20% restantes (OMS, 2020).

A classificação das áreas de transmissão no Brasil ocorre de acordo com o Índice Parasitário Anual (IPA), sendo este um indicador destinado ao monitoramento da região amazônica, enquanto a região extra-amazônica é monitorada por casos absolutos e ocorrência de surtos (Boletim Epidemiológico, SVS/MS, 2020). Através da IPA os municípios são organizados em 4 categorias, sendo considerados de alto risco aqueles que apresentam $IPA \geq 50$ casos/1000 habitantes, médio risco aqueles que possuem IPA entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, baixo risco aqueles com menos de 10 casos/1000 habitante e de muito baixo risco as áreas com IPA menor de 1 caso/1000 habitantes. A Figura 2, mostra o mapa mais recente de classificação de risco de transmissão de malária nos municípios do Brasil.

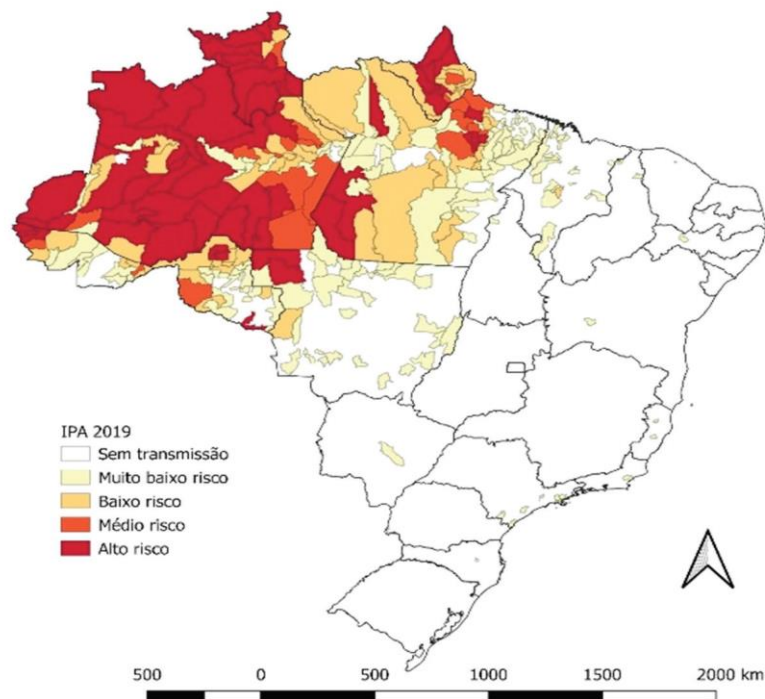


Figura 2: Áreas com ocorrência de Malária no Brasil. No Brasil os municípios são classificados de acordo com o índice parasitário anual em alto risco ≥ 50 casos/1000 habitantes, de médio risco entre 10 e 50 casos/1000 habitantes, de baixo risco < 10 casos/1000 habitante e muito baixo risco < 1 caso/1000 habitantes. SIVEP, 2020

O controle de epidemias de malária em direção à erradicação da doença tem sido uma busca constante da Organização Mundial de Saúde. As estratégias de controle se baseiam em três fatores: diagnóstico, tratamento imediato e controle do vetor (Phillips *et al.*,2017; OMS,2020). Além disso, é recomendado o tratamento preventivo em grávidas e crianças de regiões endêmicas. No mais, estratégias de imunização também têm sido exploradas (Varo *et al.*,2020).

A vacina RTS, S / AS01 é a primeira vacina contra a malária ocasionada por *Plasmodium falciparum* que demonstrou um efeito protetor em crianças pequenas em um ensaio clínico em estágio avançado (White *et al.*,2015; Varo *et al.*,2020). A vacina completou os ensaios de fase III em 2014, demonstrando eficácia de cerca de 36% contra a malária clínica ao longo de 4 anos para um esquema de 4 doses em crianças de 5 a 17 meses. A implementação da vacina piloto começou em três países africanos (Gana, Quênia e Malauí) dentro de áreas selecionadas de transmissão moderada e alta de malária e, poderia ter sua recomendação ampliada à medida que os pilotos se mostrassem seguros e demonstrassem impacto positivo na saúde (OMS,2020; Hogan *et al.*, 2020). Em outubro de 2021, finalmente a vacina foi aprovada pela OMS como o primeiro imunizante seguro e efetivo contra a doença, incluindo as formas mais graves e potencialmente fatais em crianças. Outros estudos têm sido realizados e uma nova vacina tem sido testada na busca de candidatos cada vez mais eficazes. A vacina pré-eritrocítica R21/MM demonstrou eficácia protetora de pelo menos 75% em estudo sazonal de fase 2 em crianças de 5 a 17 meses ao longo de 12 meses de acompanhamento, cumprindo as solicitações da OMS (Dattoo *et al.*,2021). A durabilidade da alta eficácia desta vacina ainda está sob averiguação, mas um ensaio de fase 3 está em andamento em cinco locais africanos de diferentes sazonalidade e taxa de transmissão de malária (Dattoo *et al.*, 2021).

O diagnóstico precoce e preciso é muito importante e evita a evolução para quadros mais graves. A Organização Mundial da Saúde recomenda a confirmação parasitológica por microscopia ou por testes de diagnóstico rápido (rapid diagnostic test - RTD), que utilizam anticorpos monoclonais para detecção de proteínas do parasito nos pacientes com suspeita da doença. Os principais anticorpos utilizados em RTD são HRP2 (*histidine-rich protein 2*), LDH e aldolase, sendo a primeira expressa somente em *Plasmodium falciparum* (Basu and Sahi, 2017). Eventualmente,

testes moleculares também são utilizados. No Brasil, o diagnóstico mais utilizado é o teste de gota espessa (OMS, 2020).

O tratamento é iniciado após o diagnóstico e, quanto mais cedo isso ocorre, maiores as chances de sobrevivência, além de se evitar possíveis complicações. Nas últimas décadas, devido à grande resistência do parasito às outras drogas, a associação de artemisinina com outros antimaláricos (terapia combinada à base de artemisina (ACT)) tem sido o tratamento mais utilizado nas infecções por *Plasmodium falciparum*, combatendo o parasita nos estágios sanguíneos (esquizontes e gametócitos) do ciclo evolutivo (Miller *et al.*, 2013; OMS, 2020). Nas Américas, a cloroquina continua sendo utilizada nas infecções de *Plasmodium vivax*, embora já tenham sido relatados casos de resistência no Brasil. Nos casos de resistência ou falha de tratamento é recomendado o uso de ACT (OMS,2020). Além disso, o uso de drogas anti-recaídas como a primaquina ou tafenoquina, sendo esta última recentemente aprovada, é necessário nas infecções por *P. vivax* ou *P. ovale* devido à presença de formas hipnozoítas (Hanboonkunupakarn and White, 2020).

O controle do vetor continua sendo essencial na luta contra a transmissão da doença. Os dois métodos mais utilizados são o uso de mosquiteiros impregnados com inseticidas, particularmente, os de longa duração (*LLIN - long-lasting insecticide-treated nets*) e a aplicação de inseticidas nas paredes internas das residências (*IRS – indoor residual spraying*) (Phillips *et al.*, 2017; OMS, 2020). Existem 4 classes de inseticidas normalmente utilizadas na pulverização residual: os organoclorados, os organofosforados, carbamatos e os piretróides (Turner *et al.*,2016). Os organoclorados como o dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) têm como mecanismo de ação o bloqueio de canais de sódio dependente de voltagem no sistema nervoso central (SNC) do mosquito. Esse mesmo mecanismo é também observado na classe dos piretróides. Organofosforados e carbamatos, no entanto, atuam inibindo a enzima acetilcolinesterase (Hemingway, 2014; Turner *et al.*, 2016). Esses inseticidas induzem hiperexcitabilidade neuronal, causando o colapso do SNC e a morte do mosquito (Costa, 2015).

Apesar da importância do DDT durante o Programa de Erradicação da Malária em 1960, o inseticida foi banido em diversos países devido à sua toxicidade, sendo ainda usado em regiões de maior endemicidade (Rahman, 2012; Griffing *et al.*, 2015; OMS, 2020). No Brasil, o uso de DDT está proibido desde 1997 (Guimarães *et al.*, 2007). Com o mesmo mecanismo de ação observado na classe dos

organoclorados e sendo mais seguros, os piretróides têm sido a principal classe de inseticida usada como estratégia no controle dos vetores, sendo ainda os únicos utilizados na impregnação de mosquiteiros (Hemingway, 2014; Turner *et al.*, 2016; OMS, 2020). Contudo, casos de resistência têm sido documentados, exigindo a busca de novas possibilidades. Os dados mais recentes da OMS sugerem a introdução de novas redes mosquiteiras tratadas com inseticidas contendo o sinergista piperonil butóxido (PBO) e inseticidas piretróides, assim como o uso de inseticidas neonicotinóides como IRS como possível alternativa (OMS, 2020).

1.1.3 Ciclo do Parasita

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

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

O ciclo se inicia quando, a partir da picada, o mosquito injeta formas esporozoítas no tecido subcutâneo, ou na corrente sanguínea (com menor frequência), do hospedeiro vertebrado (Miller *et al.*, 2002; Ashley *et al.*, 2018). Os esporozoítos presentes na derme são liberados lentamente nos capilares sanguíneos até chegar ao fígado, um processo que pode levar de 1 a 3 horas (Cowman *et al.*, 2016). Essa migração também pode ocorrer pelos vasos linfáticos. No fígado, os esporozoítas invadem as células hepáticas hospedeiras e iniciam a fase pré-eritrocítica ou ciclo hepático (Antinori *et al.*, 2012).

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

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

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

Dentro dos eritrócitos, os trofozoítos amadurecem ao longo de 24-72 horas dependendo da espécie infectante e se replicam produzindo esquizontes que podem conter de 6 a 36 merozoítos (Antinori *et al.*, 2012; Ashley *et al.*, 2018). As hemácias infectadas se rompem por processos mediados por proteínas quinase dependentes de Ca^{+2} e um complexo de ataque a membrana/domínio perforina, e os merozoítos

liberados são capazes de infectar novas hemácias (Antinori *et al.*, 2012; Miller *et al.*, 2013).

Os acessos febris, típicos da malária, são caracterizados de acordo com periodicidade do ciclo eritrocítico de cada espécie. *Plasmodium vivax* e *Plasmodium ovale* provocam acessos a cada 48 horas caracterizando a febre terçã benigna, enquanto o *Plasmodium falciparum* com acessos durante o mesmo intervalo de tempo ocasionam a febre terçã maligna. *Plasmodium malariae* provoca a febre quartã com acessos febris a cada 72 horas e o *Plasmodium knowlesi* gera febre a cada 24 horas (Antinori *et al.*, 2012). Os mais recentes, *Plasmodium brasilianum* e *Plasmodium simium* provocam febres quartã e terçã, respectivamente (Alvarenga *et al.*, 2018).

Em menor proporção, alguns trofozoítas podem amadurecer e originar gametócitos, essenciais para a transmissão da infecção a outros hospedeiros através de mosquitos anofelinos do sexo feminino (Nilsson *et al.*, 2015). A geração de gametócitos é diferenciada entre *P. vivax* e *P. falciparum*, sendo mais tardia nesses últimos (Antinori *et al.*, 2012; McQueen *et al.*, 2013). Gametócitos maduros femininos (macrogametócitos) e masculinos (microgametócitos) podem ser ingeridos pelo mosquito transmissor e iniciar o ciclo esporogônico, que culmina na formação das formas esporozoítas (Cowman *et al.*, 2016; Ashley *et al.*, 2018). Esses esporozoítas se direcionam a glândula salivar do hospedeiro vertebrado, onde permanecem até que haja um novo repasto sanguíneo seguido do reinício do processo infeccioso (McQueen *et al.*, 2013; Ashley *et al.*, 2018).

1.1.4 Imunopatogênese da Malária

Na infecção por agentes causadores da malária, a percepção da presença do parasita pelo sistema imunológico se destaca durante o ciclo eritrocítico, em que os merozoítos recém-formados são liberados dos eritrócitos na corrente sanguínea até invadirem um novo eritrócito (Cowman *et al.*, 2016; Dunst *et al.*, 2017). Durante o estágio hepático, observou-se um tipo de resposta inicial associada à IFN tipo I, contudo a resposta imunológica nesse estágio é silenciosa visto que se desenvolve bem abaixo do limiar pirogênico (Dunst *et al.*, 2017). No ciclo eritrocítico, a ação parasitária sobre os eritrócitos culmina na destruição de milhares de células vermelhas sanguíneas (RBCs - *red blood cells*) e essa ação nociva do parasita sobre o organismo do hospedeiro leva à ativação de uma resposta imuno-inflamatória de combate à

infecção (Gun *et al.*, 2014; Phillips *et al.*, 2017). O reconhecimento imune inato do plasmódio e o subsequente lançamento de citocinas são importantes no controle da infecção, mas, eventualmente, podem gerar malefícios durante uma resposta desregulada (Apinjoh *et al.*, 2013).

Durante a resposta imunológica inata, o patógeno é reconhecido através de seu epítipo imunogênico (Padrão Molecular Associado ao Patógeno-PAMPs) pelos receptores de reconhecimento padrão (RRP) presentes na célula hospedeira (Dunst *et al.*, 2017). A família de receptores Toll-like reconhece domínios do plasmódio na superfície celular e induz a resposta imune. Receptores RIG-I-like (RLR) e NOD-like (NLR) participam do reconhecimento citosólico (Gazzinelli *et al.*, 2014; Moxon *et al.*, 2019). Estudos indicam que o principal PAMP dos parasitos do gênero *Plasmodium* é o Glicosilfosfatidilinositol (GPI). Essa molécula é capaz de se ligar a receptores TLR 2 e a TLR 4 e induzir a liberação de citocinas pró-inflamatórias por células do sistema imune ativadas, notadamente macrófagos e células dendríticas (Apinjoh *et al.*, 2013; Moxon *et al.*, 2019). Glicosilfosfatidilinositol é reconhecido, preferencialmente, por heterodímeros TLR 2/TLR 1 ou TLR 2/TLR 6, em uma interação que induz a ativação de uma série de MAP quinases, tais como ERK 1/2, p38 MAPK e JNK 1/2, e culmina na produção de citocinas pró-inflamatórias (Gun *et al.*, 2014). Outro possível PAMP associado à infecção é a hemozoína, um produto da metabolização do grupamento heme pelo parasita, envolvido na ativação de receptores TLR 9 e receptores citosólicos do tipo NOD, em especial o receptor NLRP3, o que culmina com o recrutamento de ASC e caspase-1, o que leva a clivagem de pró-IL1 β a proteína ativa (Franklin *et al.*, 2011; Gazzinelli *et al.*, 2014). Padrões Moleculares Associados à Perigo (DAMPs) derivados do hospedeiro também são liberados durante a infecção e podem ser reconhecidos pelos RRP, disparando sinalização imunológica (Dunst *et al.*, 2017). O próprio grupamento heme por si quando liberado na circulação sanguínea em virtude da grande quantidade de hemoglobina lançada e não neutralizada por haptoglobina (hp), que tem a sua capacidade suprimida durante a massiva lise eritrocítica, pode ativar a resposta inflamatória ao se ligar a receptores TLR4 (Vinchi and Tolosano, 2013; Gun *et al.*, 2014). Em uma tentativa de escape do sistema de defesa do hospedeiro, os parasitas promovem o sequestro de hemácias parasitadas em sítios distantes, evitando sua destruição na passagem por órgãos como o fígado e o baço, o que vai levar a uma série de eventos patológicos posteriores característicos das síndromes graves (Craig *et al.*, 2012; Hansen, 2012).

1.2. MALÁRIA CEREBRAL

1.2.1 Fisiopatologia

A malária cerebral é a forma mais grave das infecções por *Plasmodium falciparum* e é descrita como uma encefalopatia difusa caracterizada clinicamente por um estado severo de perda da consciência ou coma profundo, sendo frequentemente associado a convulsões clínicas e subclínicas, que pode levar a ataxia, hemi ou paraplegia e, por vezes, levar ao óbito (Dorovanis-Zis *et al.*, 2011; Luzolo and Ngoyi, 2019). Considerando que os sinais e sintomas observados são comuns à outras encefalopatias, o desenvolvimento de retinopatia é o melhor diagnóstico para diferenciação do coma induzido ou não por malária, já que se pode identificar anormalidades específicas da doença observadas na microcirculação cerebral, incluindo o sequestro de parasitas (Bruneel, 2019). O principal grupo de risco é constituído por crianças abaixo dos 5 anos de idade que vivem em áreas endêmicas, como a África Sub-Saariana (Shikani *et al.*, 2012, Bruneel, 2019). No entanto, indivíduos adultos residentes de áreas não endêmicas também podem desenvolver a doença (Luzolo and Ngoyi, 2019). Cerca de 15 a 20% dos indivíduos acometidos por malária cerebral morrem, porém, aqueles pacientes que sobrevivem podem vir a desenvolver injúrias cerebrais que se manifestam como danos neurológicos e/ou neurocognitivos a longo prazo (Ponsford *et al.*, 2012; Idro *et al.*, 2016; Schiess *et al.*, 2020).

A fisiopatologia da malária cerebral é extremamente complexa e pode ser explicada por três principais mecanismos: a adesão de eritrócitos parasitados sequestrados nos microvasos do cérebro (citoaderência) causando obstrução dos vasos e hipóxia local, a ativação de uma resposta inflamatória exacerbada mediada por células efetoras e citocinas inflamatórias e disfunção de coagulação (Storm and Craig, 2014; Wah *et al.*, 2016; Bruneel, 2019).

Durante a malária cerebral, os eritrócitos infectados por *P. falciparum* sofrem modificações na superfície, tornando-os mais rígidos e inflexíveis, o que dificulta a circulação e favorece a adesividade dos mesmos (Craig *et al.*, 2012). Formas maduras do parasita no estágio sanguíneo expressam proteínas parasitárias na superfície de hemácias infectadas, tais como a proteína 1 de membrana eritrocítica

do *P. falciparum* (PfEMP1) que é codificada por uma grande e diversificada família de genes *var* envolvida na variação antigênica clonal (Wassmer *et al.*, 2016). Esta proteína possui multidomínios capazes de se ligar a receptores específicos, anteriormente citados, presentes nas células endoteliais do hospedeiro e é largamente associada à citoaderência e seus desdobramentos (Craig *et al.*, 2012; Adukpo *et al.*, 2013; Wassmer *et al.*, 2016). Domínios conservados em PfEMP-1 (*domain cassetes* - DC) 8 e 13 estão mais relacionados ao desencadeamento de eventos graves, sendo PfEMP-1 DC8 universalmente associado a malária cerebral (Luzolo and Ngoyi, 2019). Dentre os ligantes de PfEMP-1, CD36, ICAM-1 e EPCR (receptor endotelial de proteína C), especialmente os dois últimos como receptores ligantes de PfEMP-1 DC8, são os principais envolvidos no processo de citoadesão verificado no endotélio vascular cerebral (Gazzineli *et al.*, 2014; Moxon *et al.*, 2019). O EPCR ainda está relacionado à ativação de uma via pró-coagulante, interferindo na regulação normal da hemostasia associada ao controle da produção de trombina (Luzolo and Ngoyi, 2019, Bruneel, 2019).

Além de se ligar ao endotélio, as hemácias parasitadas podem promover ligações entre si, a chamada autoaglutinação, ou com hemácias não parasitadas formando as rosetas (Craig *et al.*, 2012). Leucócitos e plaquetas também estão envolvidos com o sequestro celular e agravam ainda mais o quadro de obstrução dos capilares cerebrais e o processo subsequente (Angchaisuksiri, 2014; Wah *et al.*, 2016). A citoaderência leva à obstrução dos microvasos cerebrais e redução do fluxo sanguíneo local podendo levar a condições de hipóxia, escassez de nutrientes e danos celulares com possíveis eventos hemorrágicos (Hansen *et al.*, 2012; Ponsford *et al.*, 2012; Rénia *et al.*, 2012).

Após a ativação da resposta imuno-inflamatória durante a infecção, macrófagos, neutrófilos e células dendríticas fagocitam hemácias parasitadas, o que induz a produção de citocinas (Gazzineli *et al.*, 2014). Aumentos nos níveis de fator de necrose tumoral alpha (TNF- α), interferon gama (IFN- γ), linfotoxinas (LT) e interleucinas, como IL-1 β , IL-6, IL-12 podem ser observados e contrastam com baixos níveis de IL-10 e outras citocinas anti-inflamatórias (Hansen, 2012; Hunt *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2015). Estudos revelam que o desbalanço de citocinas pró e anti-inflamatórias está associado à imunopatogênese da malária cerebral (Dunst *et al.*, 2017; Moxon *et al.*, 2019). De fato, TNF- α produzido em alto níveis pode contribuir com a severidade da doença por induzir o aumento da expressão endotelial de moléculas

de adesão como ICAM-1, VCAM-1 e E-selectina, o que aumenta a citoaderência na microvasculatura cerebral (Craig *et al.*, 2012; Souza *et al.*, 2015). Essa citocina ainda exerce efeitos pró-coagulantes nas células endoteliais, aumentando a expressão de fator tecidual no endotélio, reduzindo a secreção de ativador tecidual de plasminogênio (tPA) e aumentando o inibidor de ativador de plasminogênio-1 (PAI-1) (Angchaisuksiri, 2014). Além disso, a citocina IFN- γ também atua na expressão de moléculas de adesão (Hunt *et al.*, 2014). Ainda, quimiocinas inflamatórias como MIP-1 α , MIP-1 β , CXCL10 e IP-10, parecem estar envolvidas no tráfego de leucócitos (Apinijoh *et al.*, 2013; Dunst *et al.*, 2017).

O papel das citocinas TNF- α e IFN- γ tem sido largamente discutido no curso da infecção. A citocina TNF- α tem importância no controle do desenvolvimento do parasita e é capaz de ativar a produção de fator inibitório da migração do macrófago (MIF), sendo produzida durante a ativação macrofágica e induzindo, nessas células, a produção de óxido nítrico (NO) via iNOS e também de citocinas inflamatórias. (Sahu *et al.*, 2013; Gazzineli *et al.*, 2014; Bruneel, 2019). A citocina IFN- γ , por sua vez, também participa da ativação dos macrófagos, podendo induzir a produção de citocinas pirógenas endógenas como o próprio TNF- α , a IL-1 β e a IL-6, além de outras citocinas associadas a severidade da infecção (Hansen, 2012; Hunt *et al.*, 2014). No estágio inicial da infecção, células NK ativadas produzem IFN- γ e, posteriormente, essa citocina vai ativar células T e suas funções efetoras (Hunt *et al.*, 2014). No estágio mais avançado, células TCD4⁺ são polarizadas para o perfil T helper 1 (Th1), passando a produzir mais INF- γ e reforçando a resposta imune inata. (Hansen, 2012; Hunt *et al.*, 2014; Gazzineli *et al.*, 2014). Além disso, IFN- γ também está associada a produção de NO e radicais tóxicos (Bogdan, 2015).

Os produtos secretados por células da primeira linha de defesa, neutrófilos e macrófagos, podem agir não somente no parasita, mas também auxiliar na injúria das células endoteliais. (Wah *et al.*, 2016; Vanka *et al.*, 2020). Conforme já citado, o fenômeno de citoaderência conta não só com a participação de hemácias parasitadas, mas também com a de plaquetas ativadas e leucócitos compostos por monócitos, neutrófilos, células B e células T efetoras ativadas (TCD4⁺ e TCD8⁺) (Souza *et al.*, 2015). A ativação plaquetária induz a liberação de mediadores inflamatórios, como tromboxanos, quimiocinas e citocinas, notadamente PF4, RANTES e IL-1 β , o que favorece a vasculopatia e a resposta inflamatória (Aggrey *et al.*, 2013). Os fagócitos recrutados são ativados no local e promovem a produção de ROS (espécies reativas

de oxigênio) e RNS (espécies reativas de nitrogênio) que são parte essencial da resposta imune inata do hospedeiro (Oates *et al.*, 2006; Delhaye *et al.*, 2016; Vanka *et al.*, 2020). Entretanto, em condições patológicas, o aumento de ROS/RNS pode ocasionar um desbalanço entre espécies oxidativas e a atividade de antioxidantes, uma condição conhecida como estresse oxidativo (Percário *et al.*, 2012).

Citocinas liberadas durante o processo inflamatório estão envolvidas na geração de ROS/RNS (Zhang *et al.*, 2011; Percário *et al.*, 2012). O próprio grupamento heme, liberado em função do processo hemolítico da doença, pode contribuir com a produção dessas espécies reativas (Vinchi and Tolosano, 2013). Ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), produzido principalmente por enzimas NADPH oxidases, e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ambos intermediários de O_2 , podem agir independentemente como agentes citotóxicos ou formar outras moléculas tóxicas incluindo radicais hidroxila (OH^{\bullet}), ácido hipocloroso (HOCl) e peroxinitrito ($ONOO^-$) na presença de NO (Pino *et al.*, 2003; Percário *et al.*, 2012, Vanka *et al.*, 2020). O aumento desses agentes pode causar prejuízos a nível de lipídios, de proteínas ou mesmo de ácidos nucleicos, o que contribui com a progressão e o agravamento da doença, podendo levar a injúria tecidual local (Percário *et al.*, 2012; Cobb and Cole, 2015).

O sequestro de células na vasculatura cerebral e a resposta inflamatória podem, ainda, interferir na integridade da barreira hematoencefálica, uma barreira protetora composta por células endoteliais, pericito, células gliais e membrana basal (Hora *et al.*, 2016; Nischant and Schüler, 2019). Essa barreira seleciona a passagem de metabólitos para o tecido cerebral, o que é importante para a manutenção da homeostasia local e previne a entrada de patógenos no Sistema Nervoso Central (SNC) (Rénia *et al.*, 2012). Mishra e Newton (2009) observaram ruptura das proteínas juncionais nas células endoteliais vasculares da barreira hematoencefálica, constatado por análises pós-mortem em pacientes maláricos. Alguns autores sugerem que a oclusão dos vasos durante o sequestro celular cria um local de hipertensão que força as junções existentes entre as células do endotélio e que protegem a barreira entre o sangue e o cérebro, desse modo ocorre uma ruptura que passa a permitir a passagem de substâncias nocivas para o SNC (Rénia *et al.*, 2012). Além disso, o processo imuno-inflamatório estabelecido também contribui com o aumento da permeabilidade local devido a presença das células efetoras citotóxicas, as $TCD8^+$ (Souza *et al.*, 2015; Huggins *et al.*, 2017). Essas células expressam na sua superfície LFA-1 e VLA-1, proteínas ligantes para ICAM-1 e VCAM respectivamente, e parecem

ser cruciais para os eventos associados a patologia e complicações observadas, pois são responsáveis por liberar substâncias como a perforina, que induzem à morte celular, contribuindo com a hemorragia vascular e quebra da barreira hematoencefálica, o que leva à formação de um inchaço ou edema (Swanson *et al.*, 2016; Huggins *et al.*, 2017; Ghazanfari *et al.*, 2018).

O comprometimento da barreira hematoencefálica possibilita a exposição das células nervosas a mediadores inflamatórios e pró-oxidantes, o que pode culminar em neurodegeneração e, conseqüentemente, no desenvolvimento de danos neurocognitivos associados a doença (Combes *et al.*, 2012; Hora *et al.*, 2016).

1.2.2. Disfunção Cognitiva

A malária cerebral está associada com alta mortalidade e déficits neurocognitivos a longo prazo (Langfitt *et al.*, 2019; Schiess *et al.*, 2020). Déficits neurológicos são observados, com frequência, em crianças doentes hospitalizadas, mas grande parte se resolve dentro de 6 meses (Boivin *et al.*, 2014). Outros estudos sugerem que, após recuperação da doença, muitas dessas crianças sustentam lesões cerebrais graves, responsáveis por tais sequelas, e relatam a persistência dessas lesões por vários anos (Idro *et al.*, 2010; Bungirana *et al.*, 2011; Schiess *et al.*, 2020). Segundo Idro e colaboradores (2010), aproximadamente 25% dos infantes sobreviventes demonstraram perda cognitiva, de função motora ou danos comportamentais no período entre 6 meses a 9 anos após terem adquirido a doença. Com isso, o impacto da perda neurológica subsequente a infecções do sistema nervoso central pode ser devastador, acarretando dificuldades a nível social e econômico a seus portadores devido à redução de oportunidades de educação, trabalho ou mesmo em relacionamentos pessoais (Carter *et al.*, 2003; Oluwayemi *et al.*, 2013).

Estudos em modelos experimentais com *Plasmodium berghei* ANKA mostraram danos cerebrais em regiões importantes como fórnix, córtex e o hipocampo (Desruisseux *et al.*, 2008; Reis *et al.*, 2012). O comprometimento dessas áreas cerebrais é prejudicial em todas as esferas cognitivas como déficits de linguagem, atenção, habilidades espaços visuais, funções executivas e perda de memória, a sequela persistente mais comum (Fernando *et al.*, 2010; Oluwayemi *et al.*, 2013).

1.2.2.1 Memórias: Formação e Consolidação

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

As memórias podem ser divididas, ainda, quanto a sua temporalidade em memórias de curta ou longa duração (Izquierdo, 2013). Esse tipo de divisão é particularmente válido para memórias do tipo declarativas, e faz referência à memória formada nas primeiras horas, logo após o aprendizado (memória de curta duração) e à memória que demora horas para ser formada e é duradoura (memória de longa duração) (Izquierdo, 2008). Apesar de, a princípio, parecerem eventos subsequentes, recentemente estudos demonstraram que as memórias de curta e de longa duração ocorrem de maneira paralela, recrutando de forma independente as moléculas envolvidas no processo de formação e consolidação (Izquierdo, 2008; Izquierdo *et al.*, 2013).

O processo de formação de memória é caracterizado por uma sequência de eventos bioquímicos no hipocampo, que envolve a ativação de três diferentes tipos de receptores glutamatérgicos, o AMPA (α -amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico), o NMDA (N-metil-D-aspartato) e receptores metabotrópicos. Os receptores NMDA têm destaque por recrutarem, quando ativados, as proteínas envolvidas na sinalização que leva à formação de memória e aprendizagem (Sweatt, 2016; Lisman *et al.*, 2018). Esses receptores têm seu canal iônico bloqueado por íon Mg^{+2} quando estão inativos e só podem ser ativados na despolarização neuronal, que permite o deslocamento de Mg^{+2} e a abertura do canal iônico (Wang and Peng, 2016). A ativação de receptores AMPA permite a despolarização dos neurônios através do fluxo de íons Na^{+2} e K^{+} (Itoh *et al.*, 2016; Wang and Peng, 2016).

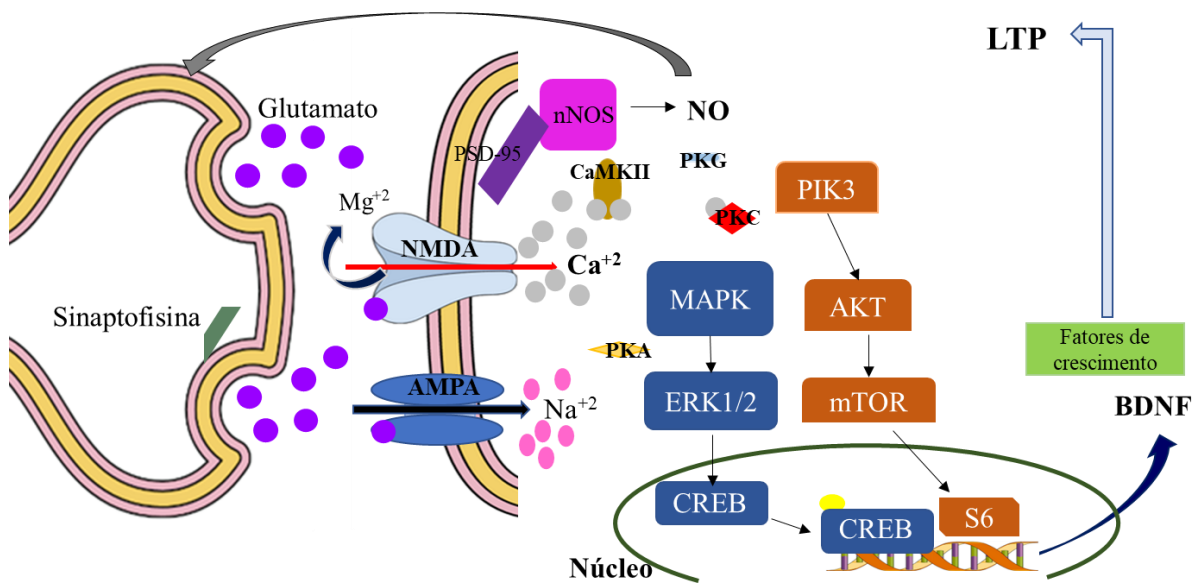


Figura 4: Via de sinalização glutamérgica disparada no processo de formação e consolidação de memória. A ativação de receptores glutamérgicos permite a ativação de uma cascata de sinalização que leva a produção de fatores de crescimento associados a formação de potenciais de longa-duração (LTP). Igreja-Silva, T.

Com a ativação dos receptores NMDA ocorre a entrada de Ca^{2+} e a consequente ativação de cascatas bioquímicas que irão promover a ativação de proteínas quinase (PKA, PKC, PKG e CaMKII) e induzir um aumento na expressão de fatores de transcrição importantes para a síntese de proteínas envolvidas na plasticidade neuronal e na formação e consolidação de memória (Izquierdo and Medina, 1997; Lisman *et al.*, 2018; Baltaci *et al.*, 2019). A ativação das vias das MAPK e PI3K/AKT leva à produção de CREB e S6, fatores de transcrição que uma vez ativados por proteínas quinase são capazes de regular a produção de neurotrofinas que vão estimular a formação de potenciais de longa duração (LTP), relacionados ao processo de formação e consolidação de memória (Figura 4) (Katche *et al.*, 2013; Lisman *et al.*, 2018). Ainda, a ativação dessa via induz a produção de NO por ativação de nNOS, um importante mensageiro retrógrado produzido pós-sinápticamente e que atua no terminal pré-sináptico favorecendo a liberação de neurotransmissores, o que induz a manutenção dos LTP e a sustentação de

sinapses, um evento importante para a plasticidade sináptica e a consolidação de memória (O'Dell *et al.*,1991; Zhuo *et al.*, 1998; Garthwaite, 2019).

Durante a ativação da via acima descrita, o fator neurotrófico BDNF (brain-derived neurotrophic factor) é uma das principais proteínas produzidas e atua tanto na formação de memórias como também na determinação de memórias consolidadas, que persistirão por poucos dias ou por semanas (Izquierdo *et al.*,2013; Itoh *et al.*, 2016; Gonzalez *et al.*,2019). Esta molécula é particularmente importante na formação de memória de longa duração e diversos trabalhos já demonstraram que reduções nos níveis fisiológicos de BDNF estão associadas às disfunções cognitivas observadas em desordens neuropatológicas, inclusive no modelo experimental de malária cerebral (Giacobbo *et al.*,2019; Wang *et al.*, 2016; Comim *et al.*, 2012).

Os LTP consistem no aumento persistente da resposta de neurônios à breve estimulação repetitiva de um axônio ou de um conjunto de axônios que fazem sinapses com elas (Sweatt, 2016). Muitos estudos têm sido realizados sobre a base molecular dos LTP na região CA1 do hipocampo para o processo de formação de memória (Izquierdo, 2008; Sweatt, 2016; Lisman *et al.*,2018; Baltaci *et al.*,2019). O hipocampo é a principal estrutura envolvida no processo de formação de memória (Izquierdo and Medina,1997). O aumento das respostas pós-sinápticas por horas, dias ou semanas parece indicar a importância de LTP na formação e armazenamento de memórias de longa duração (Izquierdo *et al.*, 2008). Para isso, a região CA1 se conecta com outras regiões cerebrais, enviando fibras excitatórias a uma região chamada subículo, que emite novas fibras para o córtex entorrinal, que emite axônios para o giro denteado, que projeta para outra região hipocampal denominada CA3, cujos axônios fazem sinapses excitatórias com células piramidais de CA1, completando o chamado sistema hipocampal (Figura 6) (Izquierdo, 2008; Goode *et al.*, 2017; Baltaci *et al.*, 2019).

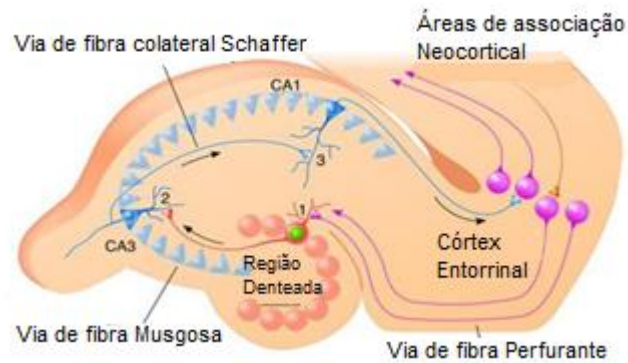


Figura 5: Circuito nervoso hipocampal relacionado ao processo de formação e consolidação de memória. Extraído de <https://netnature.files.wordpress.com/2011/02/hipocampus.jpg>

Segundo Wu e colaboradores (2013), déficits nas transmissões sinápticas do sistema hipocampal, em especial nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo, podem acarretar perdas cognitivas. A desregulação dos processos fisiológicos celulares no SNC em regiões cerebrais associadas à cognição pode estar relacionada ao desenvolvimento de complicações cognitivas.

1.2.2.2. Mecanismos associados à disfunção cognitiva

1.2.2.2.1. Neuroinflamação

Durante a malária cerebral, a neuroinflamação desencadeada auxilia a resposta inflamatória periférica na secreção de fatores pró-inflamatórios, bem como na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, amplificando a presença desses fatores no cérebro (Tronel *et al.*, 2013; Yang and Zhou, 2018). Em 2012, Reis e colaboradores demonstraram, em modelo experimental, a participação do processo de neuroinflamação no desenvolvimento do dano cognitivo observado na malária cerebral.

Em situações de desafio ou sob injúrias cerebrais, as células gliais do SNC, especialmente micróglia e astrócitos, podem ser ativadas assumindo funções neuroimunológicas (Sochocka *et al.*, 2016). Ambas as células sofrem alterações

conformacionais e funcionais ao serem ativadas por citocinas, principalmente IL-1 β e TNF- α (Greenhalg *et al.*,2020; Iovino *et al.*,2020). Esse evento é, inicialmente benéfico, visando o retorno ao estado de homeostasia local, mas pode se tornar deletério devido a resposta inflamatória local sustentada (Yang and Zhou, 2018).

Fisiologicamente, as micróglia são células conhecidas como macrófagos residentes, sendo responsáveis pelo monitoramento e vigilância local (Greenhalg *et al.*,2020). Essas células também podem participar de funções neuroprotetoras, auxiliando a plasticidade sináptica e estimulando a neurogênese, além de remover sinapses desnecessárias (Shastri *et al.*, 2013). Por sua vez, os astrócitos são as células mais numerosas do SNC e estão envolvidos em diversas funções como o desenvolvimento e função neuronal, manutenção da barreira hematoencefálica, regulação do metabolismo energético, homeostase iônica e captação e liberação de neurotransmissores (Sofroniew and Vinters, 2010; Shastri *et al.*, 2013; Greenhalg *et al.*,2020).

Durante desordens neurológicas, a ativação excessiva das células gliais acarreta a produção desregulada de fatores inflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) (Sochocka *et al.*, 2016; Yang and Zhou, 2018). O estresse oxidativo estabelecido pode afetar diversas regiões cerebrais, incluindo o córtex e o hipocampo, as principais áreas envolvidas na formação e consolidação de memória (Maiti *et al.*, 2008). Em 2010, Reis e colaboradores (2010) demonstraram a participação da produção de espécies reativas no estabelecimento do dano cognitivo observado em modelo murino de malária cerebral. O aumento de espécies reativas pode interferir na transmissão colinérgica neuronal do SNC, crucial para formação de memória. (Wiese *et al.*, 2006; Tabrizian *et al.*, 2011, Isah and Ibrahim, 2014). A desregulação das funções das células gliais potencializa uma cascata de eventos nocivos, promovendo o lançamento de fatores neurotóxicos que causam danos aos neurônios saudáveis e favorece o processo de neurodegeneração, que é caracterizado por rupturas sinápticas e vai acarretar a formação de sequelas cognitivas (Heneka *et al.*, 2014; Shrivastava *et al.*, 2017; Yang and Zhou, 2018).

1.2.2.2. Excitotoxicidade Neuronal

No sistema nervoso central, a transmissão de sinais entre neurônios ocorre através de sinapses, que podem ser elétricas ou químicas (Farley *et al.*,2014). As sinapses químicas são as mais discutidas e se caracterizam pela liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos, que interagem com receptores presentes na membrana dos neurônios alvo, gerando uma resposta neuroquímica pós-sináptica de excitação ou inibição (Lovinger, 2008; Ovsepián, 2020). O balanço entre conexões inibitórias e excitatórias é essencial para manutenção de funções apropriadas. Neurônios são especialmente sensíveis a estimulação excessiva de neurotransmissores de aminoácidos excitatórios, as excitocinas, de modo que uma desregulação sináptica pode ocasionar estimulação exacerbada de receptores neuronais que se torna nociva, culminando em um processo conhecido como excitotoxicidade neuronal (Armada-Moreira *et al.*,2020)

A excitotoxicidade neuronal é um evento que se caracteriza pela liberação de grande quantidade de excitocinas na fenda sináptica (Lewerenz and Maher ,2015). O glutamato é o principal neurotransmissor do SNC envolvido no processo (Olloquequi *et al.*,2018). O excesso de glutamato leva a ativação excessiva de seus receptores, notadamente receptores NMDA, nos terminais pós-sinápticos e isso tem mostrado ser prejudicial em desordens neurológicas, incluindo a malária cerebral (Miranda *et al.*,2010; Esposito *et al.*, 2013; Kuzmina *et al.*,2019). Miranda e colaboradores (2010) constataram que níveis aumentados de glutamato estão associados a distúrbios comportamentais observados na malária cerebral experimental.

No sistema nervoso central, os astrócitos são as principais células responsáveis pela maior parte da recaptação de neurotransmissores liberados durante sinapses por expressarem em sua superfície transportadores que auxiliam nessa função. Em eventos neuropatológicos, essas células contribuem com o processo de excitotoxicidade, pois deixam de fazer essa reciclagem devido à redução de expressão desses transportadores (Iovino *et al.*, 2020). Durante o processo neuroinflamatório, anteriormente discutido, citocinas pró-inflamatórias induzem a ativação da sinalização de NFkB, o que modula negativamente a expressão dos transportadores de glutamato, EAAT 1 e EAAT2, em astrócitos, levando ao acúmulo desses neurotransmissores no espaço sináptico (Olmos and Lladó, 2014). Além disso, o aumento da atividade de hemicanais formados principalmente por conexina (mais

abundantemente a CX43 nos astrócitos) pode potencializar o processo neurotóxico (Orellana *et al.*,2011; Orellana *et al.*,2012). Os hemicanais gliais participam da coordenação de vários processos celulares relevantes para a sinalização intercelular através da liberação de moléculas sinalizadoras parácrinas/autócrinas. Sob condições deletérias, o aumento da abertura de hemicanais também induz o lançamento de glutamato (Orellana *et al.*,2012). Além desse, outros gliotransmissores lançados como o ATP também induzem neurotoxicidade ao ativarem receptores específicos presentes em células do SNC (Orellana *et al.*,2011; Orellana *et al.*,2012). Nas células microgлияis, a molécula de ATP contribui com o evento neuroinflamatório disparando sinalização que favorece a quimiotaxia e o lançamento de citocinas (Orellana *et al.*,2011). Em neurônios, é capaz de promover a amplificação da sobrecarga de Ca^{2+} intracelular através da ativação de hemicanais neuronais, o que favorece a excitotoxicidade nos neurônios (Orellana *et al.*,2011).

Assim como os astrócitos, micróglias ativadas também podem contribuir com o aumento tóxico da concentração de glutamato, já que passam expressar a enzima glutaminase, a principal enzima responsável pela produção de glutamato. Além disso, a presença de hemicanais conexina 32 (CX32) e o sistema de transporte cisteína-glutamato (Xc^-), cuja expressão e ativação é induzida durante a inflamação, possibilitam a liberação desse glutamato produzido para o meio extracelular (Iovino *et al.*, 2020)

Conforme já foi visto, a ativação glutamatérgica de receptores NMDA localizados nos sítios sinápticos está relacionada fisiologicamente com o processo de formação de memória e aprendizagem. Durante a ativação da via de excitotoxicidade neuronal, populações extrassinápticas de receptores NMDA passam a ser superexpressas e são, também, ativadas, o que ocasiona entrada massiva de íons Ca^{+2} dentro da célula (Parsons *et al.*, 2014). Ocorre que esse desbalanço iônico leva a desregulação na transmissão do impulso nervoso e induz uma cascata de eventos que são prejudiciais ao tecido, e podem culminar em morte celular neuronal (Parsons *et al.*, 2014; Lai *et al.*, 2014; Olloquequi *et al.*, 2018).

A morte celular por excitotoxicidade não é um evento uniforme, podendo ocorrer tanto por apoptose como por necrose celular a depender da intensidade e duração do insulto. Além disso, a contribuição da ativação de vias independentes de caspase também já foi documentada (Lai *et al.*, 2014). O fenômeno é geralmente aceito como um misto de apoptose e necrose, que podem ser induzidas por diferentes

eventos decorrentes do processo fisiopatológico (Portera-Cailliau *et al.*, 1997; Anilkumar *et al.*, 2017).

1.2.2.2.1. Estresse oxi/nitrosativo e morte celular

Notadamente, a exacerbação da atividade da enzima nNOS localizada imediatamente abaixo na via (Lai *et al.*, 2014), e o consequente aumento na produção óxido nítrico (NO) é um dos principais mecanismos envolvidos na morte neuronal associada a toxicidade excitatória (Olloquequi *et al.*, 2018). Em condições de injúria, o excesso de NO pode ser nocivo ao contribuir com a formação de espécies reativas de nitrogênio (RNS) extremamente deletérias. O peroxinitrito é um dos intermediários reativos de nitrogênio mais discutidos, sendo formado pela associação de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), uma espécie reativa de O_2 , com NO durante distúrbios oxidativos. O peroxinitrito é capaz de interferir sobre vários sistemas fisiológicos do organismo, podendo acionar vias de morte por apoptose ou necrose celular (Radi, 2013; Radi, 2018). É um agente que atua sobre diversas biomoléculas, podendo ocasionar a oxidação de lipídios de membrana ou lipoproteínas, promovendo a oxidação de grupamentos protéicos ou mesmo a nitratação de resíduos que levam a disfunções de proteínas e alteram a homeostasia das sinalizações celulares (Radi, 2018). Além disso, atua em disfunções mitocondriais interferindo nos sistemas redox e bioenergético e pode, inclusive, causar danos oxidativos ao DNA celular (Islam *et al.*, 2015; Radi, 2018).

O peroxinitrito pode promover a indução de apoptose via citocromo c, com lançamento de fatores pró-apoptóticos no citosol por oxidação de componentes de transição de permeabilidade de poros mitocondriais (Radi, 2018). Essa molécula atua se ligando irreversivelmente a componentes da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria afetando sua atividade, o que acarreta acúmulo de espécies reativas de oxigênio e aumento do estresse mitoncondrial (Radi, 2013).

O peroxinitrito também é capaz de promover danos ao DNA, pois age sobre nucleotídeos purinas e desoxirribose que são vulneráveis à oxidação, o que ocasiona ruptura na cadeia de filamentos (Islam *et al.*, 2015; Radi, 2018). Injúrias ao DNA celular causadas por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (RONS), inclusive peroxinitrito, podem também induzir a apoptose por regulação positiva da expressão de p53, que atua sobre a expressão de enzimas pró apoptóticas e o lançamento de

citocromo c (Brown, 2010). Além disso, o acometimento do material genético durante o estresse nitrosativo pode induzir à morte celular por necrose. Ocorre que danos severos no DNA exacerbam a ativação de PARP-1 e esgotam NAD⁺ e ATP na célula, dando início ao processo de morte por necrose (Parcher *et al.*, 2007). Ainda, recentes observações têm sido feitas sobre o papel de PARP-1 em induzir a liberação mitocondrial do fator de indução de apoptose (AIF- apoptosis-inducing factor) levando, mais uma vez, a ativação de vias apoptóticas (Islam *et al.*, 2015).




1.3 MODELOS EXPERIMENTAIS

A avaliação da patogênese da malária é um problema devido à escassez de dados patológicos e fisiológicos em humanos (Idro *et al.*, 2010; Zuzarte-Luis *et al.*, 2014). Os estudos, principalmente das síndromes graves, são limitados, pois dependem de exames em amostras pós-morte que nem sempre são acessíveis (Shikani *et al.*, 2012). Além disso, a análise dessas amostras instrui somente sobre o estágio final da doença e não permite a avaliação da sequência de eventos que levam aos sintomas iniciais da malária cerebral ou a comparação dos casos fatais com aqueles que se resolvem em resposta ao tratamento (Zuzarte-Luis *et al.*, 2014). Desse modo, podemos mensurar a importância da experimentação animal para a investigação da patogênese da doença, já que recapitulam muitas das características do que ocorre em humanos (Desruisseaux *et al.*, 2008; Ghazanfari *et al.*, 2018).

Dentre os modelos experimentais de malária já desenvolvidos, o modelo murino é o mais amplamente utilizado nas pesquisas devido a questões éticas e de custo (Shikani *et al.*, 2012). A figura 6 mostra algumas espécies de *Plasmodium sp* utilizadas em modelos murinos: *Plasmodium yoelii*, *Plasmodium chabaudi* e *Plasmodium berghei*. Essas espécies são utilizadas por diferentes linhagens de camundongos de acordo com o foco do estudo (Matuschewski, 2013; Zuzarte-Luis *et al.*, 2014).

Nas infecções mais graves como a malária cerebral, o modelo de camundongos C57BL/6 infectado com PbA é o mais aceito (Zuzarte-Luis *et al.*, 2014; Ghazanfari *et al.*, 2018). Este modelo, frequentemente referido como malária cerebral experimental (MCE), provoca nos camundongos vários sinais que definem a malária grave em seres humanos, incluindo a acidose metabólica, angústia

respiratória aguda, disfunção hepática e danos neurológicos e comportamentais (Desruisseaux *et al.*, 2008; Cromer *et al.*, 2013). Ainda, neste modelo de MCE, observa-se pouco sequestro de hemácias parasitadas nos vasos do cérebro, onde se detecta, principalmente, leucócitos aderidos (Reis *et al.*, 2012; Cromer *et al.*, 2013). Essa é principal diferença observada entre a infecção humana e o modelo experimental, sabe-se que a maioria das células envolvidas no sequestro são leucócitos, notadamente macrófagos e células TCD8⁺ (Ghazanfari *et al.*, 2018). Esse sequestro também pode ser visto em outros órgãos, e existe o envolvimento de um processo inflamatório que se assemelha ao que ocorre nos pacientes com malária grave (Cromer *et al.*, 2013; Ghazanfari *et al.*, 2018). No entanto, a relevância do papel da resposta inflamatória para o desenvolvimento da doença em humanos e no modelo murino parece ser distinta e, enquanto a malária cerebral experimental é tida basicamente como uma síndrome inflamatória, a malária cerebral humana decorre, principalmente, em função da citoadêrencia de hemácias parasitadas e obstrução dos microvasos cerebrais (Storm and Craig, 2014; Ghazanfari *et al.*, 2018) Ainda assim, o modelo de infecção com *Plasmodium berghei* ANKA é o modelo experimental que mais se assemelha aos achados clínicos, sendo de suma importância para a compreensão da patogênese da malária cerebral, a mais complicada das síndromes maláricas de maior gravidade e suas sequelas, e foi o modelo de escolha nesse estudo.

	<i>P. berghei</i> ANKA	<i>P. berghei</i> NK65 <i>P. berghei</i> K173	<i>P. yoelii</i> 17XNL	<i>P. chabaudi</i>
 C57BL/6	ECM LI AKI ALI / ARDS	PM LI SMA ALI / ARDS	SMA	PM
 Balb/c	PM SMA AKI	PM SMA LI	SMA	SMA
 DBA/2	ALI / ARDS	SMA	-	LI

ALI / ARDS - Acute Lung Injury / Acute Respiratory Distress (Injúria Pulmonar Aguda/ Estresse Respiratório Agudo)

AKI - Acute Kidney Injury (Injúria Renal Aguda)

ECM - Experimental Cerebral Malaria (Malária Cerebral Experimental)

LI - Liver Injury (Injúria hepática)

PM - Placental Malaria (Malária placentária)

SMA - Severe Malaria Anemia (Anemia Severa por Malária)

Figura 6: Cepas de *Plasmodium sp.* que infectam diferentes linhagens de camundongos usadas em modelos murinos experimentais. Extraído e adaptado de Zuzarte-Luiz *et al.*, 2014

1.4 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS

Apesar do uso rotineiro de medicamentos antimaláricos eficazes, a taxa de mortalidade por malária grave, incluindo a malária cerebral, permanece consideravelmente alta (Varo *et al.*, 2018; OMS, 2020). Até o momento, vários tipos de terapia adjuvante ao uso de antimaláricos foram testados sem sucesso (Varo *et al.*, 2018; Bruneel, 2019). O uso da terapia adjuvante tem por objetivo a melhora do desfecho clínico e/ou redução da mortalidade, além da busca pela prevenção de déficits neurocognitivos de longo prazo. Nesse contexto, algumas abordagens terapêuticas têm sido utilizadas após o início dos sintomas neurológicos baseadas no entendimento da doença como uma patologia multifactorial (Varo *et al.*, 2018).

A malária é antes de tudo uma doença parasitária e a transfusão de sangue, no caso de altas parasitemias, tem sido proposta como terapia conjunta ao uso de antimaláricos visando o controle dos efeitos da doença em função da presença do invasor (John *et al.*,2010). Essa estratégia visa reduzir o estímulo antigênico e as respostas pró-inflamatórias à esses antígenos, além da redução da depuração de hemácias e hemólise, uma vez que as células transfundidas não são infectadas e têm deformabilidade normal (Varo *et al.*,2018).

Com base no papel crítico da resposta do hospedeiro na determinação do início, gravidade e resultado da infecção por *P. falciparum*, diferentes terapias adjuvantes imunomoduladoras têm sido avaliadas como o uso de esteróides, agentes com ação anti-inflamatória ou mesmo o uso de anticorpos monoclonais anti-TNF- α (Varo *et al.*, 2018). A Imunomodulação é uma ferramenta que visa modificar a resposta imune e direcionar diferentes vias (John *et al.*,2010). Alguns imunomoduladores também podem conter efeitos anti-oxidantes, um efeito adicional na busca da melhora do quadro clínico de malária cerebral (Varo *et al.*,2018). De fato, o uso de agentes anti-oxidantes também vem sendo testado já que o estresse oxidativo participa do estabelecimento da malária grave (Reis *et al.*, 2010; John *et al.*,2018).

Outro foco das terapias atuais é disfunção endotelial, um dos eventos característicos da doença (Bruneel,2019). O uso de reguladores do eixo da angiotensina tem sido abordado como uma interessante estratégia. A distribuição de moléculas de sinalização gasosa como NO, a administração de atorvastatina ou de vitamina D estão entre as intervenções dessa categoria, buscando melhorar a função do endotélio e o fluxo sanguíneo local (Varo *et al.*,2018). Ainda, o uso de anticoagulantes tem sido proposto com agente inibidor dos processos de citoadesão e formação de rosetas (John *et al.*,2010; Bruneel,2019).

Mesmo com os avanços acima citados, ainda hoje não existe terapia aprovada para o tratamento da malária cerebral ou prevenção dos danos neurológicos decorrentes da doença. Os estudos sobre o assunto têm proposto alvos terapêuticos direcionados aos diversos eventos associados à patogenia da doença (Varo *et al.*,2018). Em complemento ao que já se tem hoje em dia, medicamentos que atuem no direcionamento e ativação de vias de neuroproteção e sobrevivência neuronal também têm sido discutidos (John *et al.*,2018; Bruneel,2019). O uso de indutores de vias de sobrevivência e produção de fatores neurotróficos, bem como inibidores de vias indutoras

de dano celular ativadas no curso da doença têm se apresentado como interessante estratégia terapêutica em busca da neuroproteção e prevenção de sequelas neurológicas (Varo *et al.*, 2018).

A memantina é uma droga com ação inibitória de receptores NMDA extrassinápticos que estão envolvidos no fenômeno da excitotoxicidade neuronal e tem surgido como proposta terapêutica de neuroproteção (Olivare *et al.*, 2012; McShane *et al.*, 2019). A memantina já está aprovada para tratamento de casos moderados a graves do mal de Alzheimer e tem demonstrado resultados promissores quanto ao desfecho clínico da doença (McShane *et al.*, 2019). Esse medicamento tem um bom perfil de segurança e está cada vez mais sendo estudado como terapia em potencial para uso em uma variedade de distúrbios neurológicos não demenciais (Kikutchi, 2020). No presente trabalho, utilizamos a memantina como terapia de interesse, bem como um inibidor seletivo de nNOS (enzima ativada na sequência de ativação de receptores NMDA), na busca de avaliar a relevância e implicações do fenômeno de ativação glutamatérgica exacerbada neurotóxica (excitotoxicidade neuronal) para o estabelecimento da malária cerebral experimental e das disfunções cognitivas decorrentes dessa doença.

2.1 Objetivo Geral

Este estudo tem como objetivo geral avaliar os eventos associados ao processo de excitotoxicidade neuronal durante a patogênese da malária cerebral experimental e formação das sequelas cognitivas associadas à doença.

2.2 Objetivos específicos:

A partir do uso dos inibidores farmacológicos memantina, inibidor de receptores NMDA extrassinápticos (GLUN2B), e 7-nitroindazol, inibidor seletivo da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), como tratamento de camundongos infectados com PbA, objetivou-se avaliar durante o modelo experimental de malária cerebral:

- A participação da excitotoxicidade neuronal na formação da disfunção cognitiva;
- A caracterização do processo de ativação da via excitotoxicidade neuronal:
 - Expressão de receptores NMDA extrassinápticos;
 - Expressão da enzima nNOS.
- A ação da excitotoxicidade neuronal sobre o processo de neuroinflamação associado à patologia:
 - Produção de citocinas pró-inflamatórias;
 - Atividade de mieloperoxidase (MPO);
 - Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio;
 - Avaliação de marcadores de astrogliose.
- A relação entre a excitotoxicidade neuronal e a disfunção sináptica, bem como a influência do evento excitotóxico na neurodegeneração observada:
 - Avaliação da expressão de proteínas associadas à função sináptica;
 - A ativação do processo de morte celular por apoptose.

3. METODOLOGIA

3.1 Animais:

Para os ensaios de malária cerebral experimental foram utilizados camundongos machos de linhagem C57BL/6 (n=5-10/grupo) com peso de 18 a 20 gramas, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/FIOCRUZ), licença CEUA-L015/15. Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Pavilhão Ozório de Almeida, do Instituto Oswaldo Cruz. Os mesmos foram alocados em gaiolas plásticas de microisoladores ventilados, a temperatura ambiente, com livre acesso à ração e água e em ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

3.2 Manutenção e Infecção:

Cepas de *Plasmodium beghei* ANKA (PbA) foram mantidas através da coleta de sangue de animais doadores com aproximadamente 10% de parasitemia e congeladas em nitrogênio líquido, após centrifugação e substituição do plasma pela solução de congelamento. O sangue coletado foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos para separar as hemácias do plasma que é substituído por uma solução tamponada de glicerolito para que o sangue pudesse ser congelado. Para os experimentos, sangue coletado de camundongos com 10% de parasitemia foi utilizado na infecção do grupo experimental. Camundongos C57BL/6 foram inoculados com 10^6 hemácias parasitadas. Como controle, animais receberam 10^6 hemácias não parasitadas.

3.3 Parasitemia e Sobrevida

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

contagem da parasitemia dos animais. A parasitemia dos animais foi avaliada no 6º dia pós-infecção. A mortalidade foi observada todos os dias a partir da infecção e até que todos os animais morressem.

3.4 Escore Clínico de avaliação de gravidade da doença

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

3.5 Fármacos administrados

Para avaliar o papel da excitotoxicidade neuronal na malária cerebral experimental, os animais em estudo foram submetidos a inibição farmacológica pelos fármacos memantina (10 mg/kg peso corporal (p.c), 200µL, via oral diluída em NaCl 0,9%), um inibidor, preferencialmente extrassináptico, do receptor NMDA ou 7-nitroindazol (SIGMA-ALDRICH, Brasil) (25 mg/kg p.c., 200µL, via intraperitoneal diluída em salina com etanol 15% + tween 1,25%), um inibidor seletivo da enzima nNOS. O tratamento com os fármacos de interesse foi realizado de maneira terapêutica a partir do 5º dia de infecção aos primeiros sinais clínicos da doença.

Animais direcionados às avaliações cognitivas no 15º dia de infecção, receberam antimalárico cloroquina (SIGMA-ALDRICH, Brasil) (25 mg/kg p.c., 200 µL, via oral diluída em NaCl 0,9%) de maneira adjuvante ao tratamento com as drogas de interesse, durante 7 dias, a partir do 5º dia de infecção para controle e prevenção da mortalidade por níveis elevados de parasitemia.

3.6 Testes Comportamentais

3.6.1 Freezing

O teste freezing foi realizado com o objetivo de avaliar danos na capacidade cognitiva associado à resposta ao medo condicionado (Soya *et al.*, 2013). Na sessão treino, os camundongos foram colocados na caixa experimental a explorar por 5 minutos. Após esse tempo, receberam um choque de 0,6 mA por 3 segundos e, 30 segundos após o primeiro choque, os animais foram submetidos a outro choque de mesma intensidade e duração. Na sessão teste, os camundongos voltaram a caixa experimental sem receber choque e foi observado, então, o tempo em que os animais ficaram parados mediante a iminência de um possível choque. O intervalo entre as sessões treino e teste foi de 24 horas (Fanselow, 1980; Reis *et al.*, 2017).

3.6.2 Labirinto aquático de Morris (Water Maze)

O teste Labirinto aquático de Morris foi utilizado para a avaliação cognitiva de memória espacial. Durante o ensaio, os animais foram colocados em uma piscina com diâmetro de 1,04 m e com altura de 55 cm. A piscina foi dividida em 4 quadrantes, sendo que em um deles foi colocada uma plataforma de acrílico com as dimensões de (13 x 30 x 13 cm) submersa. Os animais foram treinados por 4 dias, em sessões de 60 segundos, a aprenderem o caminho até a plataforma. O tempo transcorrido até chegada do animal à plataforma (tempo de latência) foi registrado. No último dia (5º), a plataforma foi retirada e o tempo, em 60 segundos, gasto pelos camundongos no quadrante em que a plataforma se encontrava foi anotado (Morris, 1984; Reis *et al.*, 2017).

3.7 Coleta de amostras

3.7.1 - Sangue

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

3.7.2 – Cérebros

Posteriormente à coleta de sangue, foi realizada a perfusão dos animais com solução salina (NaCl 0,9 %) e, após a lavagem de todo o sangue, foi feita a abertura do crânio para a remoção do cérebro dos animais. Estes cérebros foram coletados e dissecados ou não nas regiões de interesse, córtex e hipocampo. Amostras que sofreram a dissecação após a coleta, tiveram a área de interesse isolada com o auxílio de uma lâmina de bisturi. Após a separação da área do córtex cerebral e hipocampo, utilizou-se um pincel de ponta fina para expôr a estrutura do hipocampo e separá-la do córtex, de modo a não danificar as estruturas cerebrais. Após a coleta, as amostras cerebrais foram armazenadas em freezer -80°C.

3.8 Análise de atividade de mieloperoxidase (MPO) cerebral

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

leitura das amostras em espectrofotômetro a 460 nm. O cálculo foi realizado a partir do valor da absorvância/peso das amostras cerebrais.

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

Para avaliar a resposta inflamatória através da liberação de citocinas pró-inflamatórias, foram dosados os níveis de TNF- α e IFN- γ em amostras de cérebro dos camundongos em análise utilizando-se o *kit* R&D dual set. Da mesma forma, o marcador de astrogliose, s100 β , também foi avaliado em amostras de soro.

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

3.10. Western Blotting

As amostras cerebrais coletadas foram divididas em regiões de interesse: córtex e hipocampo. Estas amostras foram maceradas em tampão de lise RIPPA (Tris-HCl 50mM; 150 mM de NaCl; Triton 1%; Deoxicolato de Sódio 0,5%; SDS 0,1%, EDTA 1mM; Ortovanadato de sódio 1mM; pH 7,5-8,0) segundo o esquema abaixo:

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

As amostras maceradas foram sonicadas e, posteriormente, centrifugadas para a obtenção do sobrenadante com as proteínas a serem analisadas. O sobrenadante coletado foi submetido à quantificação de proteínas, segundo o método de quantificação pelo kit BCA (Pierce, Thermo Scientific, EUA). Essa quantificação foi feita a partir de amostras de sobrenadante previamente diluídas 10x em solução de PBS. Após a etapa de quantificação de proteínas, as amostras foram preparadas em tampão de amostra 1:1 de modo que a concentração final de proteínas em cada poço do gel fosse igual a 50 µg/ 15µl (7,5 µL de amostra diluída em RIPPA + 7,5 µL de tampão de amostra a base de β-mercaptoenol).

Para realização do ensaio de *Western blotting*, foi utilizado o protocolo segundo o manual fabricante *Odyssey system™* (Li-Cor, Biociences, EUA). Aplicou-se 5 µl do padrão de peso molecular (*RAINBOW Odyssey system™* - Li-Cor, Biociences). Em seguida, as amostras foram submetidas à corrida de eletroforese (em gel de acrilamida 4-20%, *Mini-Protean TGX precast Gels®*- BioRad) com a aplicação de 110 V por duas horas e em seguida, foi feita a transferência para membrana de nitrocelulose (*Odyssey system™* - Li-Cor, Biociences, EUA) previamente permeabilizada em metanol 100%, utilizando tampão de transferência Tris-Glicina (Tris 25mM; Glicina 190 mM; pH 8,3) metanol 20 %. A transferência foi realizada a 400 mA por 120 minutos em sistema molhado. Após a transferência, a membrana foi incubada por 1 h com solução bloqueadora preparada com BSA (Albumina Sérica Bovina – *Bovin Serum Albumin*) a 5% diluída em TBS (Tris 10mM; NaCl 150mM; pH 8,0) 0,05% Tween®. Posteriormente, a mesma foi incubada *overnight* com anticorpo primário diluído em solução de bloqueio e TBS Tween® 1:1. Para a avaliação de marcadores do evento de excitotoxicidade neuronal foram utilizados os anticorpos

primários *rabbit* anti-GluN2B (1:1000, Abcam) e *rabbit* anti-nNOS (1:1000, Abcam). A verificação da ativação da inflamação local foi realizada através de marcação com anticorpos primário *rabbit* anti-ERK1/2 (1:1000, Abcam) e *rabbit* anti-GFAP (1:1000, Abcam), esse último como marcador de astrogliose associada a neuroinflamação. Para avaliação estresse oxidativo e nitrosativo foram utilizados anticorpos primários *mouse* anti-Hidroxinanoenal (HNE) (1:1000, Abcam) e *mouse* anti-nitrotirosina (NT-3) (1:500, Abcam). A análise da função neuronal foi realizada através da marcação com anticorpos primários anti-sinaptofisina (1:1000, Abcam) e anti-PSD-95 (1:500, Abcam). Para avaliação da morte celular, foram utilizados os anticorpos primários *rabbit* anti-caspase-3, *rabbit* anti-caspase-9 e *mouse* anti-caspase-8 (1:1000, Abcam) e para normalização da quantidade de proteínas foi utilizado o anticorpo primário *goat* anti-actina (1:10000, Abcam) para marcar a proteína constitutiva actina. As proteínas de interesse foram identificadas pela incubação da membrana, protegida da luz, por meia hora, com os anticorpos secundários (*anti-rabbit* e *anti-mouse* - Li-Cor, Biociences) diluídos em TBS Tween®. As membranas foram escaneadas e a detecção das bandas foi feita através da densitometria com auxílio do software *Odyssey Infrared Imaging system*®.

3.11. Análise estatística

As análises dos dados foram expressas como média \pm SEM. Para análise da mortalidade foi utilizado o teste Log-rank (Mantel Cox). A comparação entre as variâncias em torno da média dos grupos foi feita pelo teste de ANOVA para análise dos dados de parasitemia, escore clínico, modelos comportamentais de freezing e labirinto aquático de Morris, análise de citocinas e marcadores de neuroinflamação, expressão de receptores NMDA extrassinápticos (GLUN2B), estresse oxidativo, atividade de MPO e disfunção sináptica, utilizando-se ANOVA seguido do teste de Tukey. A análise de expressão de nNOS e morte celular foi feita por comparação entre a média do grupo infectado tratado com o grupo não tratado pelo teste t de Student. Em todas as análises, foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$.

4.RESULTADOS

4.1. Avaliação do tratamento com memantina ou 7-nitroindazol em camundongos C57BL/6 no desenvolvimento da malária cerebral experimental (MCE)

Na figura 7A observamos a curva de mortalidade comparativa entre camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* (PbA) tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol, inibidores farmacológicos de receptores NMDA extrassinápticos e da enzima nNOS, respectivamente. Essas proteínas estão diretamente relacionadas ao desenvolvimento do processo de excitotoxicidade neuronal observado em diversas desordens neurodegenerativas (Lai *et al.*, 2014) e podem estar participando do processo de neurodegeneração associado à malária grave. Conforme indicado no gráfico, não houve diferença de mortalidade entre os grupos estudados. A figura 7B mostra a parasitemia dos grupos analisada no 6º dia após a infecção, em que surgem os picos parasitêmicos. Os dados obtidos demonstraram que não há diferença estatística quanto a carga parasitária observada entre os grupos tratados ou não tratados com as drogas memantina ou 7-nitroindazol, que se manteve em torno de 20% para todos os grupos. Ainda, na figura 7C, avaliou-se o escore clínico obtido de animais infectados com PbA submetidos ou não ao tratamento com os inibidores farmacológicos testados. As análises comportamentais indicativas de dano neurológico foram feitas segundo parâmetros de gravidade (Reis *et al.*, 2010), no sexto dia pós-infecção. Assim como observado em relação à mortalidade e parasitemia, tanto camundongos tratados como não tratados com memantina ou 7-nitroindazol após a infecção com PbA desenvolvem a malária cerebral, apresentando escore clínico superior a 3.

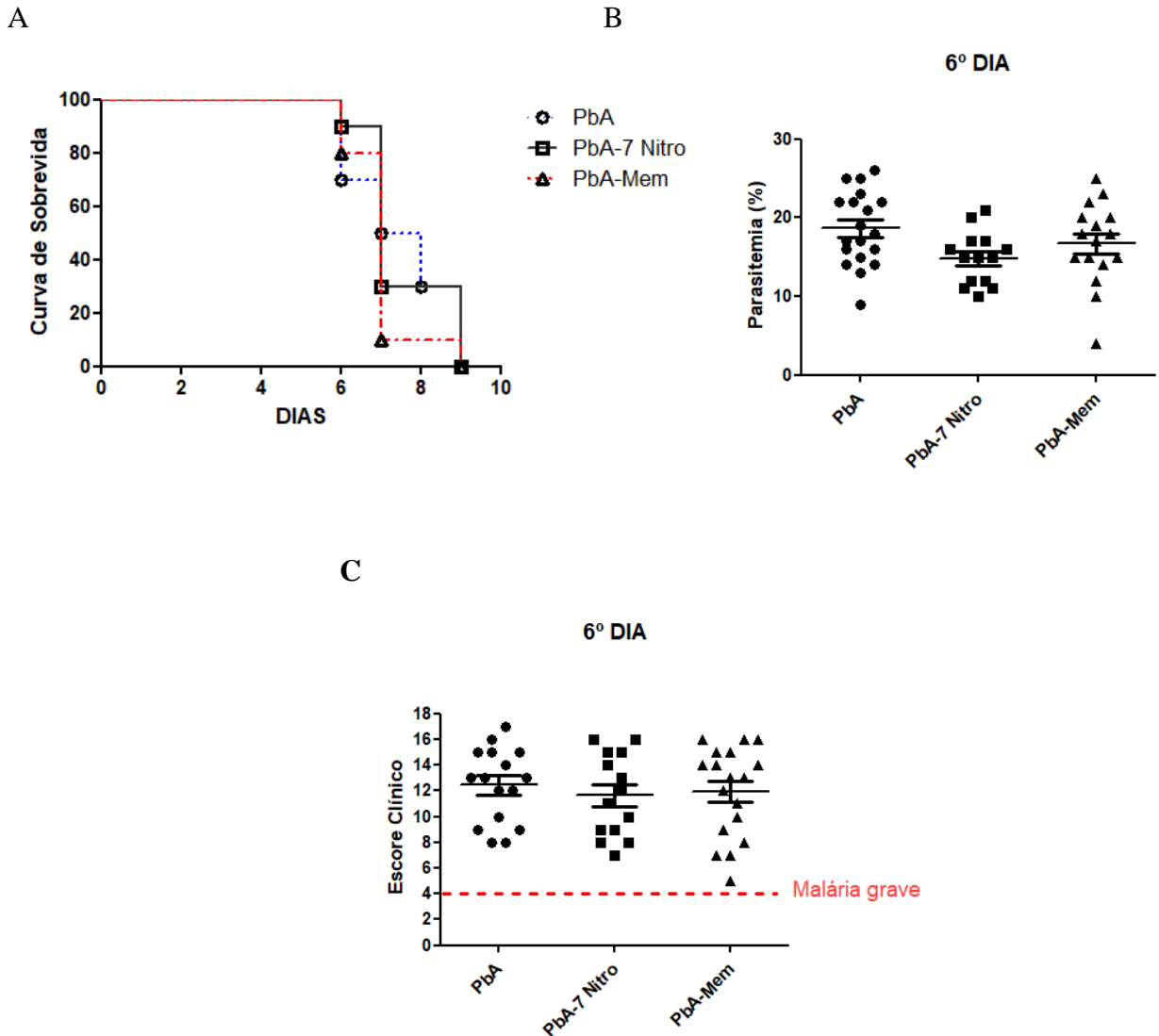


Figura 7. Avaliação de curva de mortalidade, parasitemia e escore clínico de camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) tratados ou não com inibidor de NMDA extrassináptico (memantina) ou inibidor da enzima nNOS (7-nitroindazol). 7A-Avaliação da mortalidade entre camundongos infectados tratados com memantina ou 7 nitroindazol em comparação com infectados não tratados, no sexto dia pós-infecção (n= 5-10/grupo) *p<0,05 pelo teste Log-rank (Mantel-Cox). 7B-Parasitemia de camundongos C57/BL6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol comparada com camundongos não tratados durante a infecção por PbA. 7C- Avaliação de escore clínico de gravidade no 6º dia após a infecção (n= 5-10/grupo) *p<0,05 pelo teste ANOVA, post-hoc Tukey

Figura 4.2. Avaliação de disfunção cognitiva em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

A figura 8 apresenta a análise da capacidade cognitiva de animais, não infectados ou recuperados da infecção com PbA pelo tratamento com o antimalárico cloroquina, após a administração de inibidores farmacológicos de NMDA extrassinápticos ou da enzima nNOS, a partir da avaliação de formação e consolidação de memória aversiva (teste de *freezing*, Figura 8A) e da memória espacial (teste water maze, Figura 8 B, C, D).

Na figura 8A, observamos as análises obtidas pelo teste de *freezing*. Nesse teste, camundongos infectados com PbA apresentaram desenvolvimento do dano na formação de memória aversiva, mostrando menor tempo de imobilidade ($*p < 0,05$ teste de Tukey) quando comparados ao controle não infectado. Camundongos infectados submetidos ao tratamento com memantina ou 7-nitroindazol não apresentaram perda de memória pelo teste de *freezing*, o que parece significar que a inibição de moléculas atuantes na via de excitotoxicidade neuronal oferece proteção quanto a formação de dano cognitivo associado à perda de memória aversiva. De modo a corroborar esse resultado, foi a averiguada a capacidade de aprendizado e a consolidação de memória espacial em camundongos C57BL/6 tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol pelo teste labirinto aquático de Morris (Water-maze). Durante os 4 primeiros dias de teste, foi observado o tempo de deslocamento dos animais até uma plataforma submersa, de modo a verificar a progressão do aprendizado quanto à localização da plataforma colocada em um dos quadrantes da “piscina”. O resultado obtido mostrou que camundongos C57BL/6 tratados com os respectivos inibidores de receptores NMDA extrassinápticos ou da enzima nNOS mantém a capacidade de aprendizado que é perdida durante a infecção com PbA (Figura 8B, C). No quinto e último dia de análise, essa plataforma foi retirada, observando-se o tempo de permanência dos animais no quadrante previamente ocupado pela mesma, de modo a avaliar a formação e consolidação de memória que é prejudicada em função da infecção por PbA. Os resultados corroboraram as análises já obtidas no ensaio de memória aversiva, de modo que camundongos submetidos ao tratamento com a drogas em estudos não apresentaram perda de memória espacial (Figura 8D). Esse resultado indica, mais uma vez, que o bloqueio da ativação de vias excitotóxicas confere proteção quanto às funções cognitivas durante a infecção.

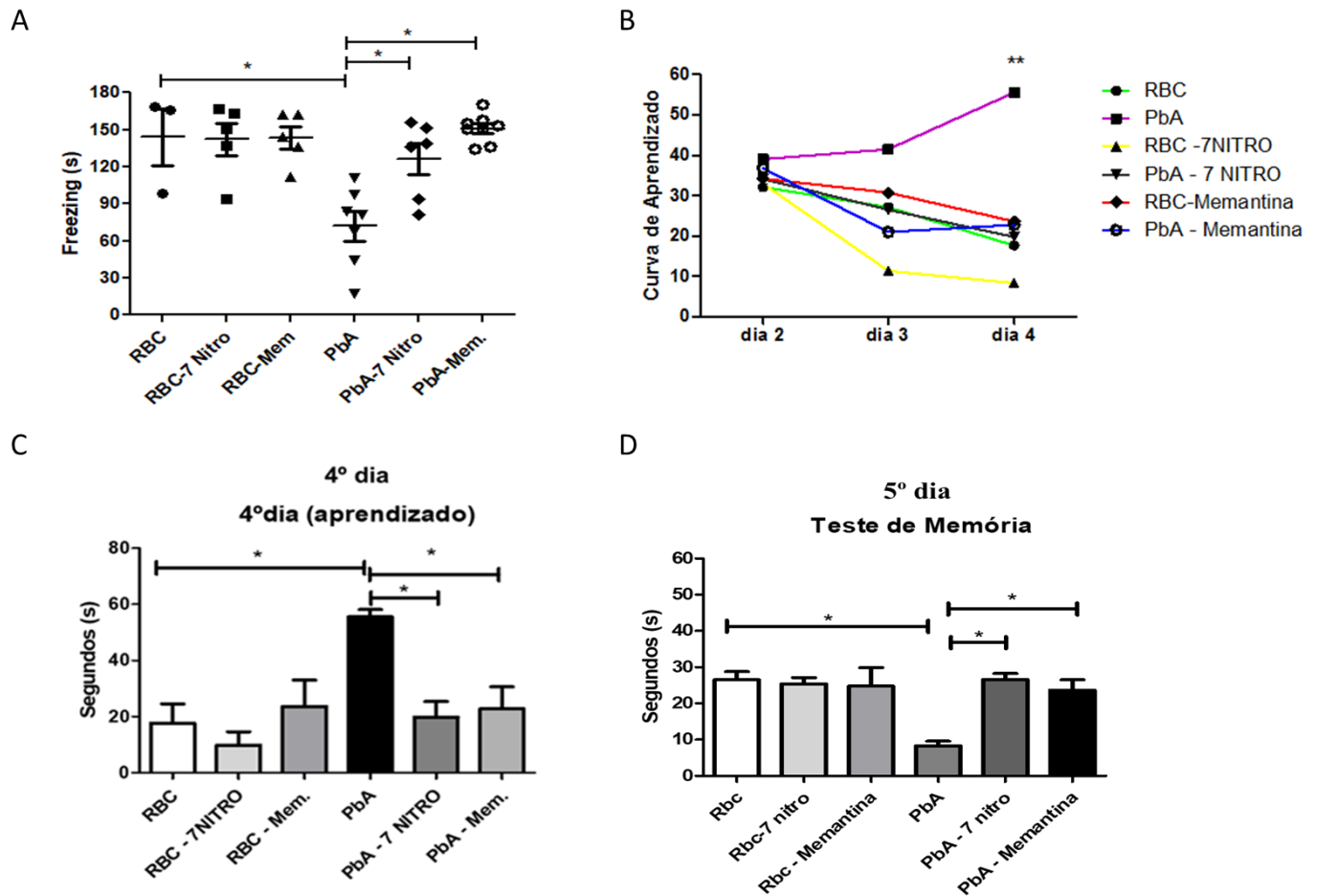


Figura 8. Avaliação de dano cognitivo em camundongos C57BL/6 infectados com *Plasmodium berghei Anka* (PbA) tratados ou não com inibidor de NMDA extrassináptico (memantina) ou inibidor da enzima nNOS (7-nitroindazol). Camundongos C57BL/6 (n=5-10/grupo) foram infectados com 10^6 PRBC com *P. berghei* ANKA e tratados do dia 6 ao 12 pós-infecção com cloroquina (25 mg/kg p.c. v.o). Aos primeiros sinais clínicos do estabelecimento da malária cerebral, os animais foram tratados ou não com memantina (10mg/kg p.c. v.o) ou 7-nitroindazol (25mg/kg p.c.v.ip). **8A-Avaliação da memória aversiva pelo teste freezing.** Durante a sessão treino, os animais receberam um choque de 0.6 mA (3 s) após 3 minutos (180 segundos) dentro da caixa e outro 30 s após o primeiro. Após 24 horas (teste), foi avaliada a perda de memória representada pelo tempo de movimento dos animais na caixa de avaliação durante 180 segundos. **8(B, C, D) - Avaliação da capacidade de aprendizado (8B e 8C) e memória espacial (8D) através do Labirinto aquático de Morris (Water Maze).** No 15º dia, os animais foram colocados em uma piscina com uma plataforma submersa e foram treinados a aprenderem o labirinto até a plataforma. Foram realizadas 4 sessões treino de 60 segundos. A última sessão treino (4º dia) corresponde ao dado de avaliação da capacidade de aprendizado dos animais baseado no tempo de deslocamento até a plataforma. Após 24 horas (5º dia), a plataforma foi retirada e foi avaliada a formação e consolidação de memória, avaliando-se por 60 segundos o tempo de permanência dos camundongos no quadrante em que a plataforma se encontrava anteriormente. * $p < 0,05$ pelo ANOVA test, pos-hoc Tukey.

4.3. Avaliação da expressão de receptores NMDA extrassinápticos em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

Os receptores NMDA estão envolvidos em diversos processos fisiológicos do SNC. Em condições de injúria, a expressão e ativação de receptores deste tipo em sítios extrassinápticos pode favorecer a ocorrência de danos e induzir a degeneração do tecido (Esposito et al.,2013). Os dados aqui obtidos (Figura 9) demonstraram que durante a infecção com PbA existe, de fato, um aumento na expressão de receptores NMDA extrassinápticos em comparação com o controle não infectado. Ainda, na mesma análise, conseguimos observar que o tratamento tanto com o inibidor direto desses receptores, a memantina, quanto com o 7-nitroindazol reduziram a expressão de NMDA extrassinápticos quando comparado ao animal infectado com PbA não tratado.

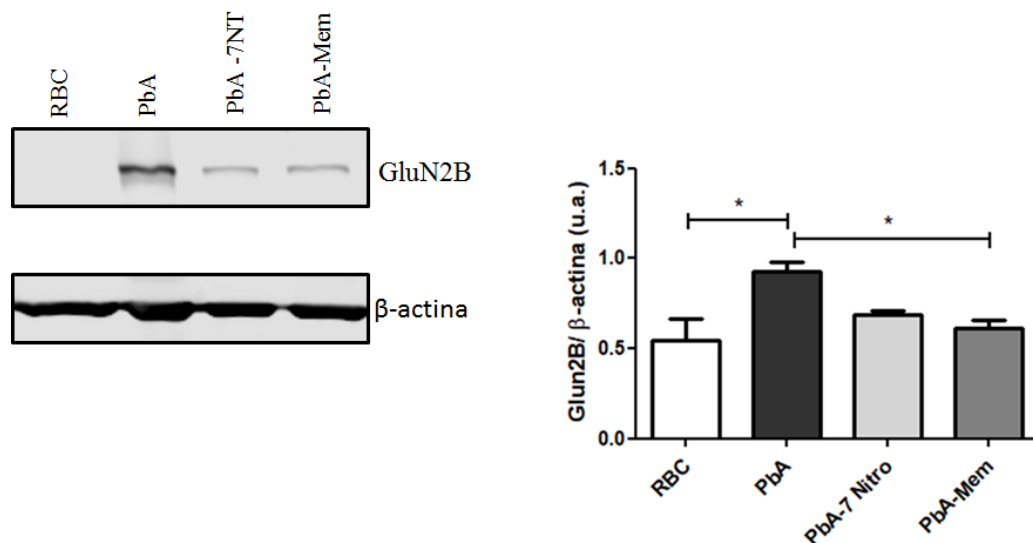


Figura 9. Avaliação da expressão de receptores NMDA extrassinápticos (GLUN2B) em camundongos infectados tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental. Amostras de hipocampo de animais infectados com PbA foram coletadas no 6º dia após a infecção e analisadas por western blotting. (n= 5-10/grupo). * p<0,05 pelo teste ANOVA, post-hoc Tukey.

4.4. Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

A figura 10 mostra que durante a infecção com PbA ocorre um aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS), uma proteína ativada “downstream” a ativação de NMDA e que também tem sido associada a ocorrência de patologias neurodegenerativas (Misra et al., 2013; Lai et al., 2014). Conforme podemos observar na figura 10, os tratamentos com memantina ou 7-nitroindazol foram eficazes em impedir o aumento da expressão da nNOS nos animais infectados. Ambos os grupos tratados mostraram diminuição significativa na expressão de nNOS observada durante a malária cerebral experimental quando comparados ao controle infectado com PbA.

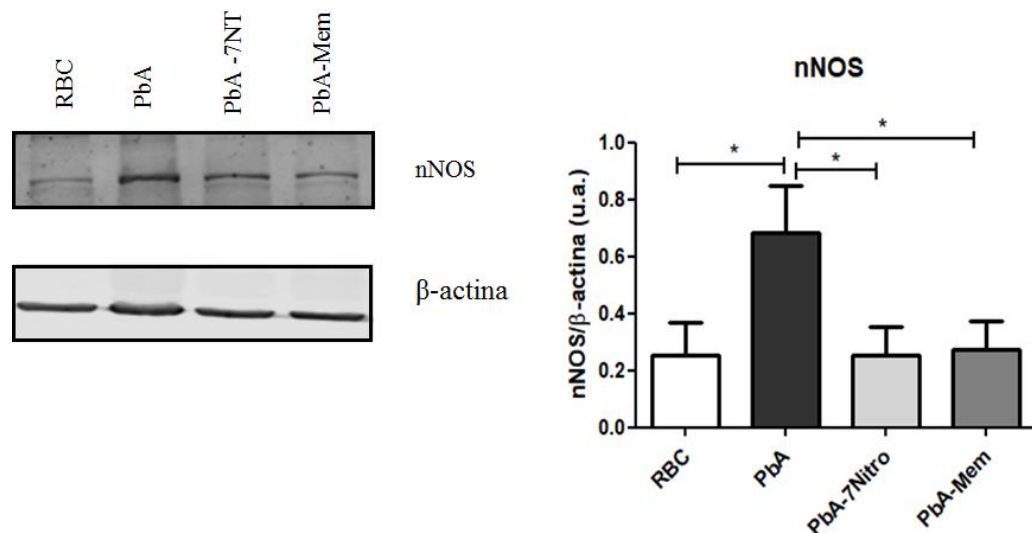


Figura 10. Avaliação da expressão da enzima óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) em camundongos infectados tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental. Amostras de hipocampo de animais infectados com PbA foram coletadas no 6º dia após a infecção e analisadas por western blotting. (n= 5-10/grupo). * p<0,05 pelo teste t de Student

4.5. Avaliação da produção de citocinas pró-inflamatórias em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

A produção de citocinas no parênquima cerebral pode ser observada em função da neuroinflamação estabelecida no curso da malária cerebral (Hansen *et al.*, 2012). A figura 11 mostra produção de citocinas TNF- α (Figura 11A) e IFN- γ (Figura 11B) no cérebro de camundongos infectados com PbA, tratados ou não com memantina e 7-nitroindazol. O resultado mostra que existe aumento de expressão de ambas as citocinas no 6º dia após a infecção com PbA. No entanto, o uso dos inibidores farmacológicos memantina ou 7-nitroindazol conteve esse aumento, de modo que camundongos infectados tratados mostraram níveis normais de TNF- α e IFN- γ no tecido cerebral.

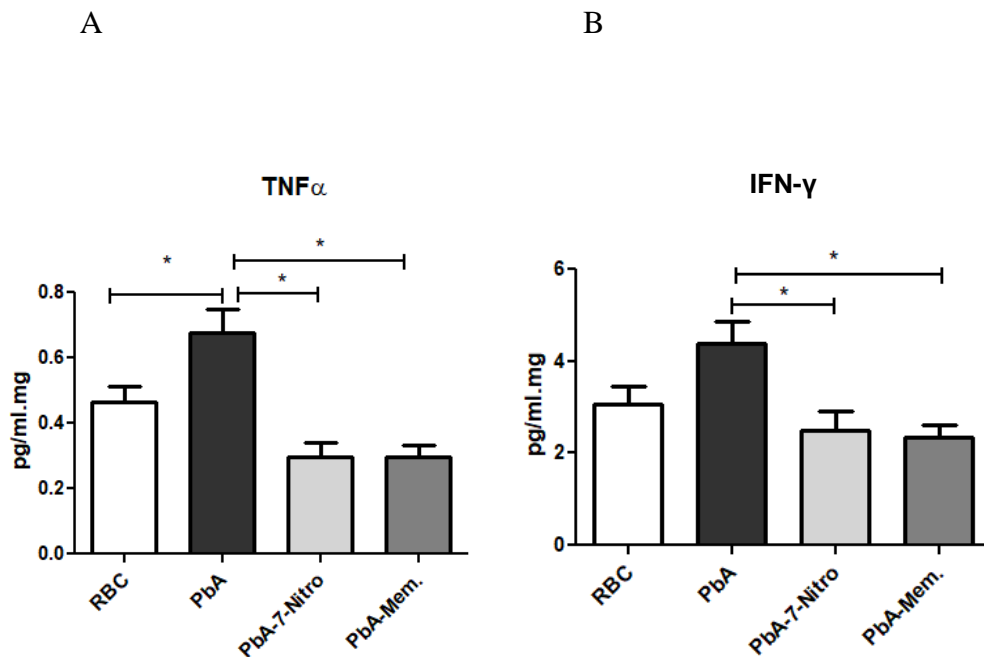


Figura 11. Avaliação da produção de TNF- α e IFN- γ no cérebro de camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol. Amostras de cérebro total coletadas no 6º dia após a infecção foram submetidas a análise por ELISA (n= 5-10/grupo). *p<0,05, ANOVA test, post-hoc Tukey.

4.6. Avaliação da ativação de ERK1/2 em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

A cascata de sinalização da via da MAPK pode ser ativada em resposta à malária, via ativação de receptores do tipo Toll, participando da produção de mediadores inflamatórios (Zhu *et al.*,2005). A figura 12 mostra a análise de expressão das proteínas ERK1/2 em sua forma ativada. Podemos observar que a infecção com PbA induziu aumento na expressão de ERK1/2 fosforilada e que o tratamento com memantina ou 7-nitroindazol foi capaz de reverter essa ativação. Ambos os tratamentos testados foram eficazes em manter os níveis de expressão da proteína fosforilada ao nível do controle não infectado.

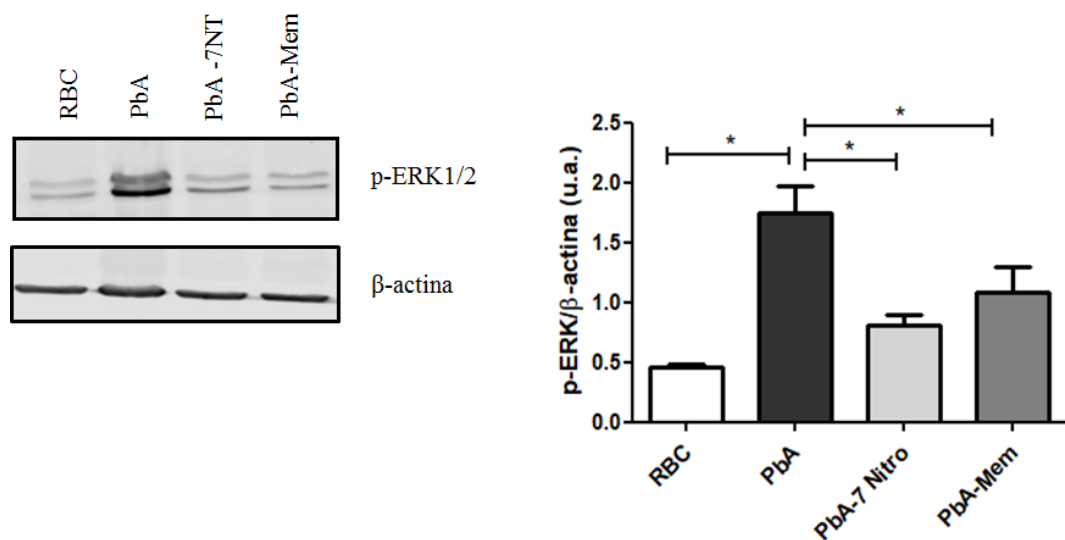
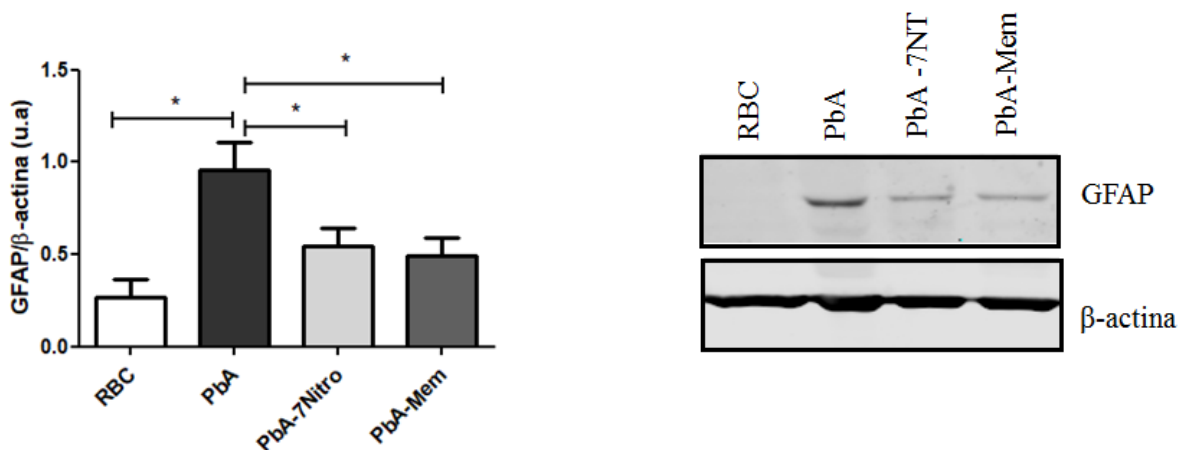


Figura 12- Avaliação da expressão de ERK 1/2 em camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol. Amostras de hipocampo de animais infectados com PbA foram coletadas no 6º dia de infecção e analisadas por western blotting. (n= 5-10/grupo) *p<0,05, ANOVA test, post-hoc Tukey

4.7. Avaliação da astrogliose em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

Astrócitos são células que participam de várias desordens neurológicas. Essas células podem ser ativadas em situações de injúria e participar de eventos que comprometem o tecido nervoso e podem levar a neurodegeneração (Garwood *et al.*, 2017). A Figura 13A mostra a expressão da proteína GFAP (proteína ácida fibrilar glial), envolvida na ativação de astrócitos (Middledorp and Hol, 2011). Observamos que a expressão dessa proteína mostra-se significativamente aumentada durante a infecção com PbA. Conforme é possível observar, o tratamento com memantina ou 7-nitroindazol foi eficaz na redução da expressão de GFAP. De modo a corroborar essa análise, a proteína s100 β , típica de astrócitos e usada como um marcador de lesões cerebrais em neuropatologias (Kirchhoff *et al.*, 2008; Barateiro *et al.*, 2016), também foi avaliada por ELISA nesse bloco de dados. Na figura 13B, constatou-se que essa proteína está aumentada durante a infecção com PbA. Isso foi revertido significativamente pelo tratamento com a droga memantina, porém não pelo 7-nitroindazol. Os resultados obtidos sugerem uma possível proteção de ambos os tratamentos quanto a ativação de astrócitos observada durante o estabelecimento da doença.

A



B

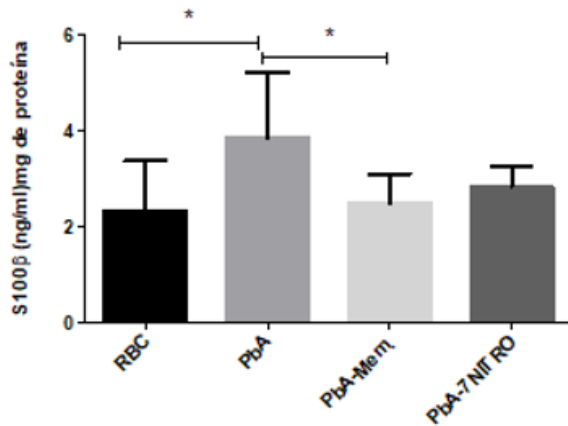
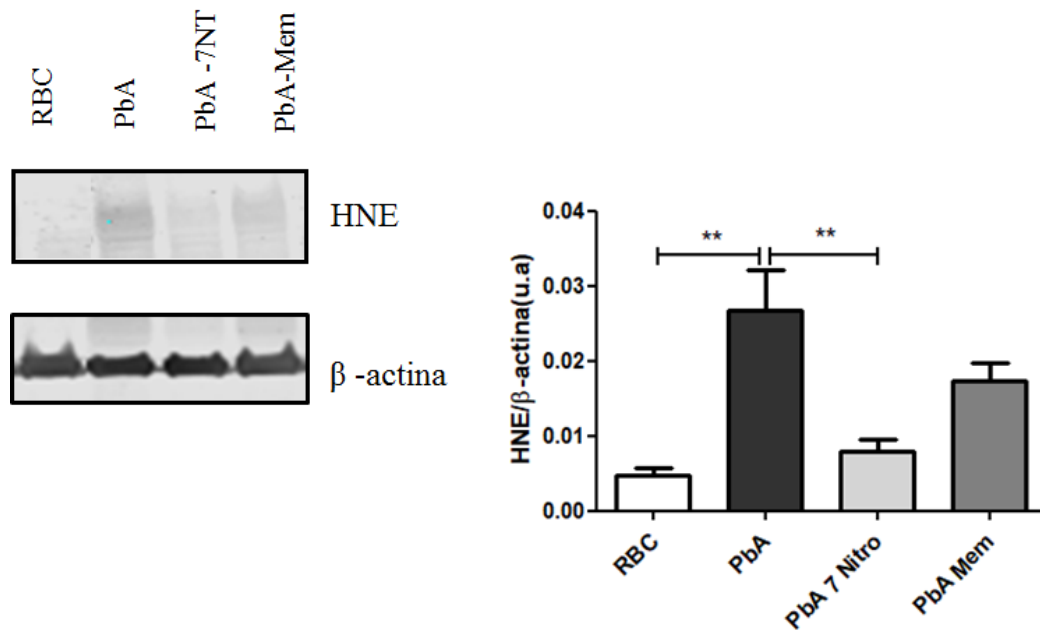


Figura 13. Avaliação da expressão de GFAP e produção de S100β em camundongos infectados tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental. 13A- Amostras de hipocampo de animais infectados com PbA foram coletadas no 6º dia após a infecção e analisadas por western blotting. 13B-Níveis da proteína S100β produzidos em amostras de cérebro total no 6º dia após a infecção foram avaliados por ELISA (n= 5-10/grupo). * $p < 0,05$ pelo teste ANOVA, post-hoc Tukey.

4.8. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

O estresse oxidativo é uma condição comum observada em doenças com caráter inflamatório, inclusive na malária (Percário, 2012; Kim *et al.*, 2015). A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio foi avaliada entre os grupos em estudo a partir de dados referentes à análise da expressão de marcadores bem descritos, o Hidroxinanoenal-4 (HNE) (Breitzig *et al.*, 2016), um marcador associado a peroxidação lipídica e a Nitrotirosina-3 (NT-3), um marcador de estresse nitrosativo (Khun *et al.*, 2004). Na figura 14, observou-se que a infecção com PbA leva ao aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio no hipocampo dos animais, o que foi revertido pelo tratamento com memantina ou 7-nitroindazol. Na figura 14A, o tratamento com 7-nitroindazol diminuiu significativamente a expressão de HNE em animais infectados. Na figura 14B, isso foi observado para ambos os tratamentos. Os dados sugerem, portanto, que o processo de excitotoxicidade neuronal participa da produção de espécies reativas no estabelecimento da doença.

A



B

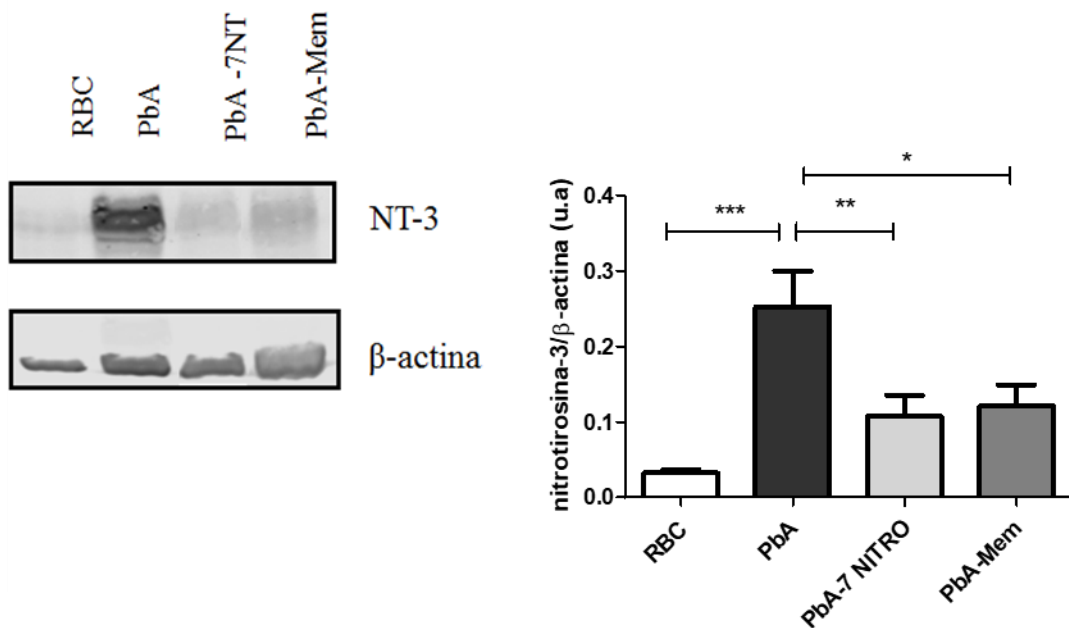


Figura 14. Avaliação de estresse oxidativo no tecido cerebral de camundongos C57BL/6 tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental. Amostras de hipocampo de animais infectados com PbA foram coletadas no 6º dia após a infecção e analisadas por western blotting. 14A- A Figura mostra a expressão de Hidroxinanoenal (HNE) entre os grupos experimentais. 14B- A figura mostra a expressão de nitrotyrosina-3 (NT-3) entre os grupos experimentais (n= 5-10/grupo). * $p < 0,05$ pelo teste ANOVA, post-hoc Tukey.

4.9. Avaliação da atividade de mieloperoxidase (MPO) em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

A figura 15 mostra que existe um aumento na atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) durante a infecção com PbA. O mesmo não é observado em camundongos infectados que foram submetidos aos tratamentos com memantina ou 7-nitroindazol. Conforme observado no gráfico, ambos os tratamentos revertem o aumento na atividade da MPO, de modo que a atividade dessa enzima foi similar ao observado no controle não infectado.

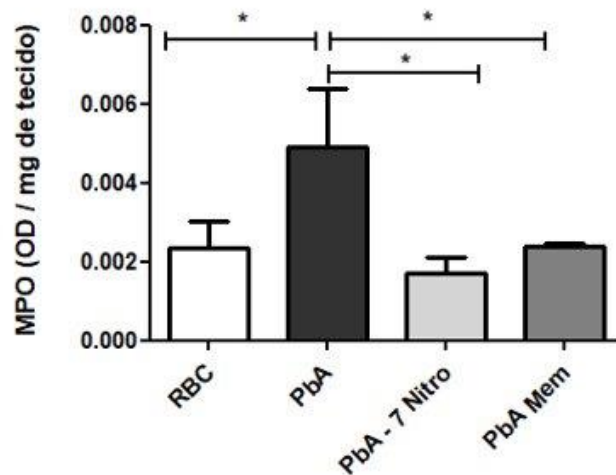


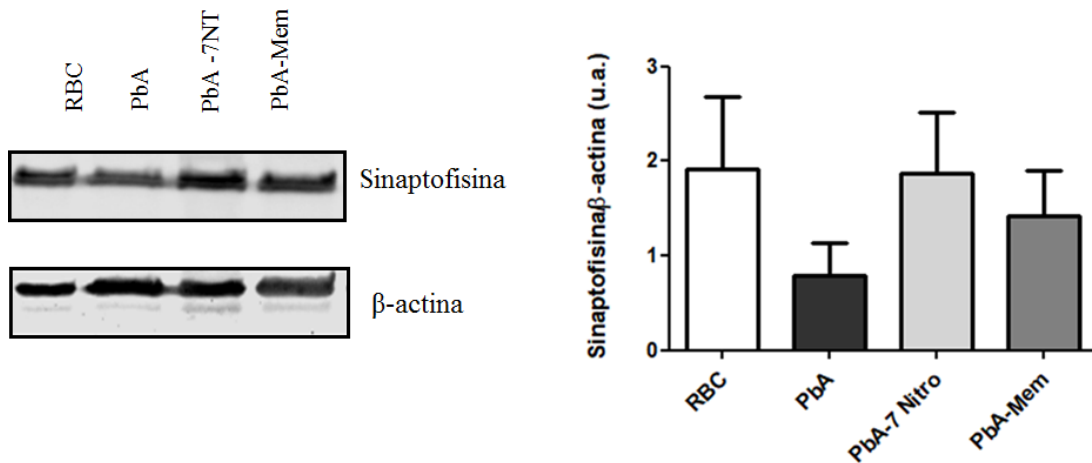
Figura 15. Avaliação de mieloperoxidase (MPO) no tecido cerebral de camundongos tratados com memantina ou 7-nitroindazol após a infecção com *Plasmodium berghei* ANKA. Amostras de cérebro total foram coletadas no 6º dia após a infecção para posterior análise (n= 5-10/grupo). *p<0,05 pelo teste de ANOVA com post-hoc teste de Tukey

4.10. Avaliação da expressão de proteínas pré-sinápticas e pós-sinápticas em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

A figura 16 mostra os níveis de expressão de sinaptofisina e PSD-95 no curso da malária cerebral experimental. Na figura 16A é possível observar, claramente, que a expressão da proteína pré-sináptica, sinaptofisina, tende a reduzir durante a infecção por PbA e que esse evento parece estar sendo minimizado pelo tratamento com memantina ou 7-nitroindazol. Apesar dessa tendência, não foi

observada diferença significativa entre os grupos analisados. Contudo, na figura 16B, foi constatado que a enzima pós-sináptica PSD-95 aumenta sua expressão durante a infecção com PbA se comparada ao controle não infectado, um efeito que foi significativamente revertido pelo tratamento com 7-nitroindazol.

A



B

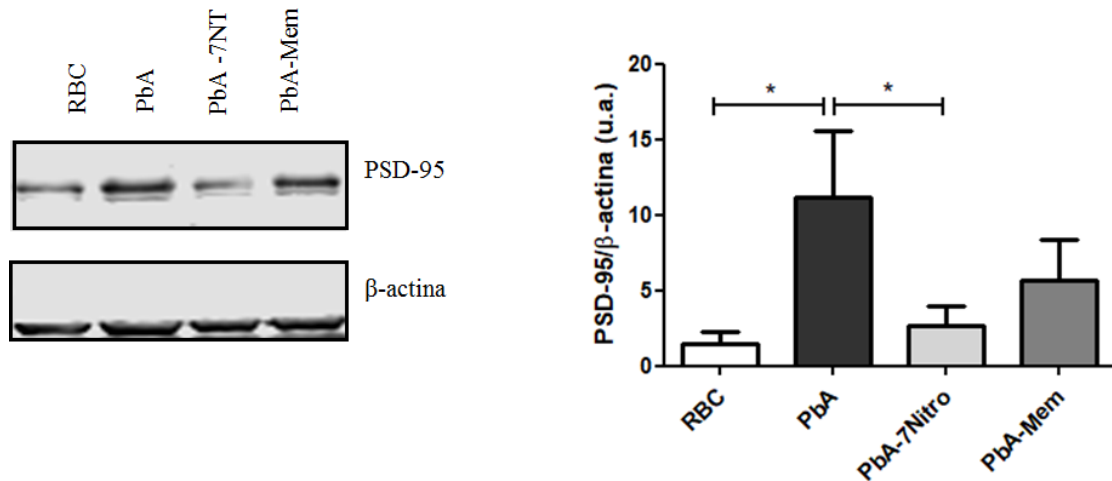
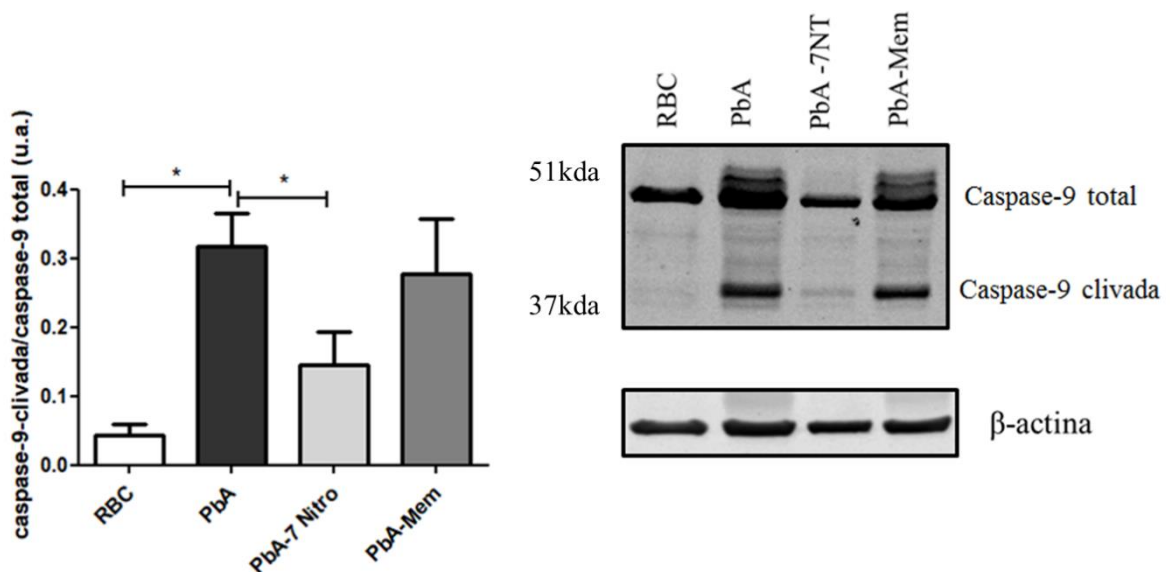


Figura 16. Avaliação da expressão de PSD-95 e sinaptofisina em camundongos infectados com *Plasmodium berghei ANKA* tratados ou não com memantina ou 7-nitroindazol. Amostras de hipocampo de animais infectados com PbA foram coletadas no 6º dia de infecção e analisadas por western blotting. 16A – A figura mostra a expressão da proteína pré-sináptica sinaptofisina. 16B-A figura mostra a expressão da proteína pós-sináptica PSD-95. (n= 5-10/grupo) *p<0,05, ANOVA test, post-hoc Tukey.

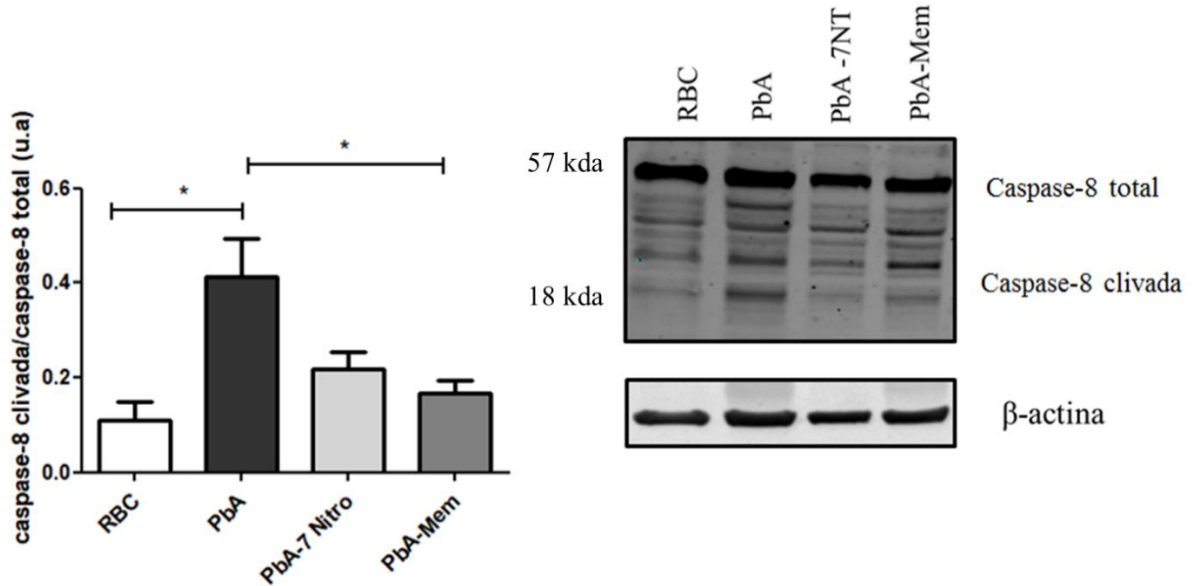
4.11. Avaliação de apoptose celular em camundongos C57BL/6 tratados com memantina ou 7-nitroindazol durante a malária cerebral experimental

A malária cerebral se caracteriza por eventos que levam a danos teciduais e sequelas cognitivas (Reis *et al.*,2010; Reis *et al.*,2012). Essas podem estar relacionadas a perdas neuronais por ativação de processos de morte celular (LeBlanc, 2005). Avaliamos a morte celular apoptótica em hipocampo de camundongos infectados com PbA submetidos ou não ao tratamento com memantina ou 7-nitroindazol, no 6º após a infecção, através do aumento nos níveis de caspase-8 caspase-9 e caspase-3 em sua forma ativa, clivada. Nessa figura, observou-se, na região do hipocampo, que durante a infecção com PbA há um aumento nos níveis de caspase-9, caspase-8 e caspase-3 clivada que foi revertido pelos tratamentos com memantina ou 7-nitroindazol. Na figura 17A, podemos ver que o uso da droga 7-nitroindazol inibiu significativamente a ativação de caspase-9 no hipocampo. Na figura 17B, verificamos a inibição significativa da ativação de caspase-8 pelo tratamento com memantina. Ainda, ambos os tratamentos foram eficazes em inibir o aumento de expressão de caspase-3 clivada (figura 17C) observado durante a infecção, sugerindo que a inibição do processo de excitotoxicidade confere proteção quanto à ativação de vias de de morte celular por apoptose.

A



B



C

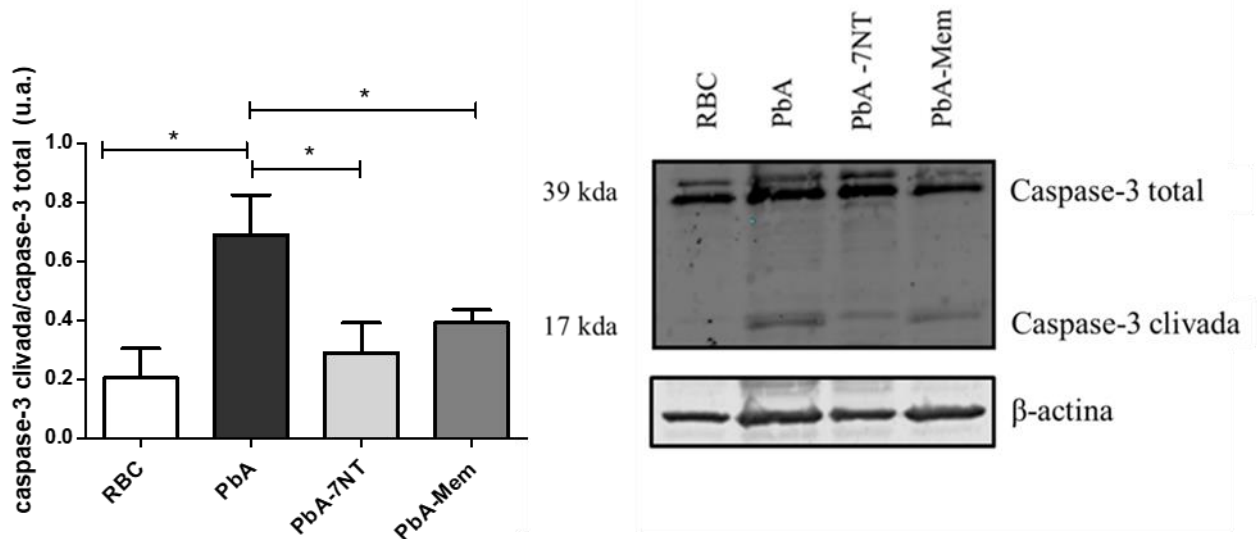


Figura 17. Avaliação da ativação das vias intrínseca e extrínseca de apoptose em camundongos infectados com *Plasmodium berghei* ANKA tratados ou não com memantina ou 7-nitridazol no 6º dia após a infecção. Amostras de hipocampo foram coletadas e analisadas por western blotting. 17A-Níveis de caspase-9 clivada. 17B-Níveis de caspase-8 clivada. 17C- Níveis de capase-3 clivada. (n= 5-10/grupo) *p<0,05 teste t de Student.

DISCUSSÃO:

A malária continua sendo um sério problema de saúde pública e afeta, principalmente, as populações pobres de áreas tropicais e subtropicais. Em 2019, foram 229 milhões de novos casos e 409 mil mortes (OMS,2020). A malária cerebral é uma das complicações mais graves ocorridas pela infecção por *Plasmodium falciparum* e conta com altos índices de mortalidade, principalmente, em crianças abaixo dos 5 anos de idade (Idro *et al.*, 2016; OMS,2020).

Os principais fatores clínicos relacionados a malária cerebral são perda da consciência e coma, e pacientes que sobrevivem, cerca de 25%, podem apresentar sequelas cognitivas decorrentes do comprometimento do sistema nervoso central (Idro *et al.*, 2016). Boivin e colaboradores (2007) descreveram a malária cerebral como a principal causa do déficit cognitivo observado em crianças de áreas endêmicas, caracterizado por disfunções de longo prazo, incluindo dificuldades de linguagem, problemas comportamentais, déficits de atenção e memória. Esses danos ocorrem independentemente da administração de antimaláricos nos pacientes, o que demonstra a necessidade da busca por novas terapias voltadas à reversão desse quadro.

Algumas disfunções neurológicas se caracterizam por compartilhar eventos fisiopatológicos semelhantes e a excitotoxicidade é considerada o maior mecanismo de morte celular associado a patogênese de doenças do sistema nervoso central, como isquemia, trauma e doenças neurodegenerativas (Wang *et al.*, 2010). A excitotoxicidade neuronal é um processo patológico pelo qual células nervosas são danificadas ou mortas por estímulo excessivo de neurotransmissores, em especial o glutamato (Wang *et al.*, 2010). O glutamato é o neurotransmissor mais abundante no corpo, estando presente em cerca de 50% do tecido nervoso, e tem um importante papel na excitação neuronal (Mehta *et al.*, 2013; Kuzmina *et al.*,2019). De fato, Olney e colaboradores (1969) já haviam descrito o potencial neurotóxico desse neurotransmissor, de modo que a ativação prolongada de receptores glutamatérgicos rompe a homeostasia iônica e pode disparar cascatas de morte celular em neurônios (Choi *et al.*,1988; Wang *et al.*, 2010; Olloquequi *et al.*,2018). Os receptores glutamatérgicos podem ser classificados como receptores ionotrópicos (receptores AMPA, NMDA e cainato) e receptores metabotrópicos (Satller and Tymiansky, 2001; Wang *et al.*,2010). A ativação desses receptores permite a abertura de canais iônicos,

o que possibilita a entrada de íons Na^{+2} e Ca^{+2} dentro da célula (Choi *et al.*,1988; Wang *et al.*, 2010). Dentre esses receptores, o receptor NMDA tem sido o mais largamente associado a excitotoxicidade glutamatérgica devido a sua vasta distribuição no sistema nervoso central e alta permeabilidade ao íon Ca^{+2} , o mediador chave dos danos decorrentes do processo de excitotoxicidade (Mehta *et al.*, 2013; Olloquequi *et al.*,2018).

Receptores NMDA podem ser encontrados tanto nos sítios sinápticos como fora deles (Parsons *et al.*, 2014). Em condições normais, a ativação de receptores NMDA nos sítios sinápticos contribui com a produção de neurotrofinas e está associada a sobrevivência neuronal (Vizi *et al.*, 2013; Parsons *et al.*, 2014). Receptores NMDA extrassinápticos são, normalmente, ativados pelo transbordamento ou lançamento de grande quantidade de glutamato, de modo que a ativação desses receptores acarreta uma sinalização de natureza oposta ao que se observa em sítio sinápticos e tem sido relacionada às injúrias que levam a morte neuronal através do processo de excitotoxicidade (Vizi *et al.*, 2013). Neste trabalho, buscou-se avaliar o papel da excitotoxicidade neuronal durante o curso da malária cerebral experimental. Em desordens neurodegenerativas, inibidores farmacológicos não competitivos de receptores NMDA têm sido utilizados como estratégia terapêutica (Olivares *et al.*,2012). No Alzheimer, a memantina, que é inibidora seletiva de receptores NMDA extrassinápticos tem sido utilizada e vem se mostrando eficaz em prevenir o dano neuronal, melhorando déficits cognitivos e comportamentais (Xia *et al.*,2010; Olivares *et al.*,2012; McShane *et al.*,2019). No presente estudo, a memantina e também o 7-nitroindazol, inibidor seletivo da enzima nNOS (uma enzima ativada “downstream” na via), foram utilizadas como ferramenta farmacológica de inibição da via de excitotoxicidade neuronal após a infecção de camundongos C57BL/6 com *Plasmodium berghei ANKA*, o principal modelo experimental de malária cerebral.

A análise de alterações neurológicas é importante em doenças que afetam o sistema nervoso central, pois são indicadores da gravidade da doença (Rogers *et al.*,2001; Martins *et al.*,2010). Neste trabalho, a avaliação do escore de gravidade foi realizada com base em dezoito sinais clínicos específicos encontrados na malária cerebral, uma avaliação que já vem sendo realizada nos trabalhos do nosso grupo (Reis *et al.*,2012). Pileação, corpo arqueado, andar vacilante, convulsões, paralisia de pata, coma, taxa de respiração, cor de pele, batimento cardíaco, lacrimação, fechamento de pálpebras, força ao agarrar, perda de tônus dos membros, perda de

tônus abdominal, perda de tônus corporal, alteração de temperatura corporal, interesse pelo ambiente e escape ao toque foram as alterações averiguadas no 6º dia após a infecção com PbA. Primeiramente, observamos que ambos os tratamentos propostos, administrados no 5º dia após a infecção, não tiveram qualquer influência quanto a carga parasitária, que manteve números similares entre os grupos tratados ou não tratados. Isso já foi observado em trabalhos anteriores, em que o tratamento isolado com inibidores de NMDA, mesmo administrados em tempos mais precoces, não diferem quanto a parasitemia observada em animais infectados não tratados (de Miranda *et al.*, 2017). Os resultados demonstraram que a inibição da via de excitotoxicidade neuronal pelo tratamento com memantina ou 7-nitroindazol não é capaz de reverter o surgimento da malária grave, que ocorre entre o 5º e o 6º dia após a infecção com PbA, uma vez que todos os grupos experimentais desenvolveram a malária grave e morreram a partir do 7º dia de infecção.

Em doenças neurodegenerativas, déficits de memória e aprendizagem são constantemente observados (Hugo *et al.*, 2014). Em observações clínicas, é visto que perdas cognitivas podem ocorrer mesmo depois de meses do tratamento com antimaláricos, o que indica que o tratamento da infecção em si não é suficiente para reverter o dano cognitivo e exige a busca de novos tratamentos com esta finalidade (Idro *et al.*, 2010; Langfitt *et al.*, 2019). No trabalho aqui exposto, grupos experimentais foram submetidos à avaliação cognitiva de perda de memória após o tratamento com cloroquina (25 mg/kg v.o.). Memória é um ente que pode ser dividido em dois tipos principais: a memória de curta duração, que ocorre nas primeiras horas de formação e logo após o aprendizado, e a memória de longa duração, que demora horas para ser formada e é duradoura (Izquierdo *et al.*, 1998). Segundo Izquierdo (2008), os processos de evocação mostram claras diferenças quanto ao requerimento molecular entre as memórias de curta e longa duração. No primeiro caso, os principais envolvidos são receptores AMPA glutamatérgicos, enquanto na formação de memória de longa duração, receptores glutamatérgicos NMDA e metabotrópicos também são ativados, variando, especialmente em tempo de ativação, de acordo com a estrutura cerebral (Izquierdo *et al.*, 1998; Izquierdo *et al.*, 2006). Diferentes cadeias de eventos moleculares estão relacionadas a formação da memória prolongada no hipocampo, na amígdala basolateral, no córtex entorrinal, no córtex parietal e no córtex cingulado (Izquierdo *et al.*, 2006). A ativação dos receptores NMDA mobiliza a entrada de íons Ca^{+2} na célula, o que leva a ativação de cascatas bioquímicas que irão promover a

ativação de diferentes proteínas quinase (PKA, PKC, PKG e CaMKII) e induzir um aumento na expressão de fatores de transcrição importantes para a síntese de proteínas envolvidas na plasticidade neuronal e na formação e consolidação de memória (Izquierdo, 2008). Contudo, como descrito anteriormente, a superativação desses receptores causa perturbação do processo fisiológico e provoca danos ao neurônio (Wang *et al.*, 2010). Neste trabalho, foram utilizados testes de disfunção de memória para avaliar a possível participação da excitotoxicidade neuronal no dano cognitivo decorrente da malária cerebral experimental. As memórias do tipo aversivo, bem como as associadas ao movimento e orientação no espaço, são memórias extremamente conservadas e largamente associadas à sobrevivência do ser no meio ambiente em que se encontra (Vorhees *et al.*, 2014; Izquierdo *et al.*, 2016). Utilizamos o teste *freezing* (resposta condicionada ao medo) para a avaliação de memória aversiva (Izquierdo *et al.*, 2016). A memória espacial foi averiguada através do desempenho dos camundongos no labirinto aquático de Morris (*Morris water maze*) (Vorhees *et al.*, 2014) Os resultados obtidos mostraram que camundongos infectados e tratados com memantina ou 7-nitroindazol não desenvolvem sequelas cognitivas. Isto sugere que, de fato, existe um evento de neurotoxicidade associado a ativação em demasia de receptores NMDA que perpassa também pela ativação de nNOS e que contribui com déficits de cognição associados ao desenvolvimento da malária cerebral.

Receptores NMDA são proteínas tetraméricas que diferem na composição de suas subunidades (Vycklicky *et al.*, 2014). Eles são proteínas constituídas de 7 subunidades diferentes, classificadas em 3 subfamílias de acordo com a homologia da sequência: a GLUN1, a GLUN2, que possui 4 subunidades distintas (GLUN2A, GLUN2B, GLUN2C, GLUN2D) e a GLUN3, que possui um par de subunidades (GLUN3A e GLUN3B) (Vycklicky *et al.*, 2014). Normalmente, esses receptores fazem associações de GLUN1 com subunidades GLUN2 ou misturam subunidades GLUN2 com GLUN3 (Paolletti *et al.*, 2013; Vycklicky *et al.*, 2014). Essa vastidão de subunidades homólogas permite variadas combinações e a existência de diversos subtipos de receptores NMDA no sistema nervoso central (Paolletti *et al.*, 2013). Como cada subtipo de receptores NMDA apresenta diferentes propriedades, é possível que individualmente eles possam desempenhar funções específicas tanto em condições normais como durante eventos patológicos (Paolletti *et al.*, 2013; Papouin *et al.*, 2014). Somado a isso, receptores NMDA de localização extrassináptica parecem ter maior

envolvimento na patogênese de algumas doenças neurodegenerativas (Mehta *et al.*,2013; Parsons *et al.*,2014). De fato, alguns trabalhos têm levantado essa discussão, de modo que o bloqueio desse tipo de receptor tem demonstrado acarretar benefícios e contribuir com a melhora do quadro observado nesse tipo de patologia (Hardingham *et al.*,2002; Bakiri *et al.*,2010; Yu *et al.*,2015). Uma vez que receptores NMDA extrassinápticos são ricos em heterodímeros contendo GLUN2B (Paolletti *et al.*, 2013), foi avaliada a expressão de NMDA extrassinápticos caracterizado pela subunidade GLUN2B durante a malária cerebral experimental. Realmente, foi observado que a doença induz um aumento na expressão desses receptores, o que foi prontamente revertido pelo tratamento com a droga inibidora seletiva, memantina. Curiosamente, a inibição da enzima nNOS pelo tratamento com 7-nitroindazol também foi capaz de produzir o mesmo efeito. A NOS neuronal é uma proteína ativada na mesma cascata de sinalização de ativação de NMDA e responde produzindo NO que participa como segundo mensageiro, podendo atuar de maneira retrógrada na liberação do neurotransmissor glutamato (O'Dell *et al.*,1991). Não se sabe se o NO produzido de maneira desregulada durante a excitotoxicidade neuronal poderia estar contribuindo com o fenômeno, promovendo o lançamento de mais glutamato no meio, uma vez que já foi demonstrado que a concentração desse neurotransmissor aumenta durante a malária cerebral experimental (Miranda *et al.*,2010). De fato, a expressão de nNOS está aumentada na malária cerebral experimental. O aumento de expressão de proteínas NOS já foi observado em algumas neuropatologias e pode levar a produção exacerbada de NO, favorecendo a produção de espécies reativas e contribuindo com a progressão da doença (Wang *et al.*,2010; Nakamura *et al.*,2010; Hannibal *et al.*,2016). Tanto a produção de glutamato como a produção de NO deverão ser analisadas como perspectivas futuras desse projeto. Aqui, foi observado que ambos os tratamentos foram eficazes em reduzir a expressão de nNOS durante a malária cerebral experimental.

A malária cerebral é uma patologia complexa que apresenta diversos mecanismos envolvidos em seu processo de formação. A oclusão da microvasculatura cerebral decorrente do fenômeno de citoaderência e a intensa resposta inflamatória associada a presença do parasita são os principais fatores envolvidos (Hansen *et al.*, 2012). A inflamação mediada por citocinas provoca ativação do endotélio e leucócitos recrutados para o local de sequestro e causa o aumento da permeabilidade da barreira hematoencefálica (Hansen *et al.*,2012). A quebra da barreira hematoencefálica é

consequência do dano endotelial provocado pela congestão dos vasos cerebrais e pelo estresse oxidativo seguido de apoptose ao qual as células endoteliais são submetidas (Punsawad *et al.*,2013). Isso facilita o contato das citocinas pró-inflamatórias com o sistema nervoso central e a ativação de células gliais (Mander and Brown,2005; Lécuyer *et al.*,2016). A exemplo de células imunológicas do sistema periférico, microglias e astrócitos, células do sistema nervoso central, são ativadas frente a estímulos de perigo, sendo capazes de produzir citocinas e radicais livres no parênquima cerebral (Mander and Brown, 2005) Nossos resultados mostraram que o tratamento com memantina ou 7-nitroindazol foi capaz de reduzir significativamente os níveis de TNF- α e IFN- γ no cérebro de camundongos infectados comparados com o controle infectado não tratado. Ambas as citocinas estão associadas com o desenvolvimento da malária cerebral (Kinra and Dutta, 2013; Mandala *et al.*, 2017; Shabani *et al.*, 2017) e a diminuição em seus níveis de produção denota a relevância da participação da excitotoxicidade neuronal em relação a patogênese da doença e suas sequelas. Além disso, a ativação de ERK1/2 fosforilada mostrou-se também aumentada no curso da doença. Proteínas MAP quinases são ativadas na resposta imune de defesa do hospedeiro contra o parasita, em que glicofosfatidilinositol (GPI), o principal PAMP (Padrão Molecular Associado a Patógenos) associado à malária, se liga a receptores Toll-like do tipo 1 e 2 (Zhu *et al.*,2005). Estudos prévios têm demonstrado a participação da ativação de receptores Toll-like no processo de neurodegeneração relacionado a injúrias do sistema nervoso central (Okun *et al.*,2009). Essa sinalização está relacionada à produção de mediadores inflamatórios durante a infecção (Gun *et al.*,2014). O resultado obtido mostrou que ambos os inibidores analisados reduzem a expressão de proteínas ERK1/2 ativadas, o que pode estar diretamente envolvido na redução da produção de citocinas pró-inflamatórias observadas. Já foi visto, previamente, que citocina TNF- α induz neurotoxicidade por facilitar lançamento de glutamato através da regulação positiva da expressão de glutaminase e impedir sua recaptção pelas proteínas envolvidas na captação desse neurotransmissor (Clark *et al.*,2016). Além disso, a ativação desregulada de receptores NMDA e de nNOS pode induzir produção de espécies reativas de oxigênio (Mehta *et al.*,2013; Chamorro *et al.*,2016) e acredita-se que esse possa ser mais um dos mecanismos envolvidos na estimulação desses mediadores inflamatórios durante a excitotoxicidade neuronal, inclusive associada à ativação de proteínas ERK (Colucci-D'amato *et al.*,2003). É importante destacar, também, que alguns trabalhos já têm

proposto a atuação anti-inflamatória da droga memantina (Wu *et al.*,2009; Chen *et al.*,2012), porém maiores investigações precisam ser realizadas e a análises de outras citocinas pró e anti-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, RANTES, IL-10.

Microglia e astrócitos são células gliais comumente ativadas em desordens neurodegenerativas (Chung *et al.*,2015). Durante a malária cerebral, ambas as células produzem e secretam uma série de mediadores durante o processo neuroinflamatório (Bentivoglio *et al.*,2011). Os astrócitos são as células gliais mais abundantes do sistema nervoso central e têm como funções fisiológicas o suporte neurovascular metabólico, a recaptção de neurotransmissores, o tamponamento de íon potássio e a remoção de espécies reativas de oxigênio através da produção de antioxidantes (Pekny and Nilsson, 2005; Bentivoglio *et al.*, 2011; Greenhalg *et al.*,2020). Notadamente, eles possuem suma importância para a homeostasia de neurotransmissores no cérebro. A recaptção de glutamato é particularmente importante e a remoção desse neurotransmissor do espaço extracelular pode prevenir os eventos associados a excitotoxicidade (Acosta *et al.*, 2017). Neste trabalho, foi avaliado o efeito do tratamento com memantina ou 7-nitroindazol no aumento de expressão de proteína ácida fibrilar glial (GFAP), um filamento intermediário que é muito utilizado como marcador de astrócitos reativos (Pekny and Nilsson, 2005). Os resultados aqui obtidos mostraram que ambos os tratamentos impediram a astrogliose observada no curso da malária cerebral experimental. Além disso, a produção de s100 β , um marcador de astrócitos reativos em desordens neurológicas (Acosta *et al.*, 2017), foi avaliada. A proteína s100 β é um ligante de Ca⁺² altamente expresso e secretado por astrócitos no sistema nervoso central e que, dependendo do estímulo recebido, pode atuar tanto como fator neurotrófico como um mediador inflamatório (Sheng *et al.*,1994). Situações de estresse metabólico como a liberação exacerbada de glutamato provoca aumento na produção de s100 β (Sheng *et al.*,1994; Donato *et al.*, 2009; Guerra *et al.*, 2011). Nessas condições, essa proteína pode ser regulada por citocina e diversos trabalhos já discorreram sobre sua participação em neuropatologias. Gerlai e colaboradores (1995) mostraram que superexpressão de s100 β em astrócitos induz alterações de plasticidade e comprometimento cognitivo. Trabalhos anteriores já mostraram que os níveis de s100 β estão elevados durante a malária cerebral (Medana *et al.*,2007). Corroborando a análise anterior, os níveis dessa proteína diminuíram devido ao tratamento com memantina. Esses resultados sugerem que a inibição da via de excitotoxicidade neuronal contribui com a

homeostasia em astrócitos, indicando melhora no processo neuroinflamatório estabelecido durante a infecção.

As complicações da malária cerebral têm sido largamente associadas a desregulação do balanço redox (Pradhan and Ghosh, 2013). A atividade exacerbada de células imunológicas tem como um dos efeitos o aumento descontrolado da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS) que sobrepõem a atividade dos antioxidantes e causam o estresse oxidativo (Percário et al.,2012). Como discutido anteriormente, células gliais também contribuem para esse processo. A ativação de enzimas óxido nítrico sintase respondem pela alta produção de NO, o que pode ser prejudicial durante insultos nocivos (Mander and Brown, 2005). Aqui, vimos que a enzima nNOS sofre aumento de expressão durante o curso da doença. Já é bem descrito que, em condições de estresse oxidativo, pode haver associação de NO com espécies reativas de oxigênio formando intermediários reativos de nitrogênio (RNS), como o peroxinitrito (Radi, 2013; Radi, 2018). Essa molécula é altamente reativa e está envolvida em vários eventos danosos ao organismo, podendo causar danos a níveis celulares e moleculares (Radi, 2013; Prolo et al.,2014; Radi, 2018). Avaliamos o efeito do tratamento com memantina ou 7-nitroindazol na formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio através do HNE, um subproduto da peroxidação lipídica observada em condições de estresse, e da nitrotirosina (NT-3), um marcador de estresse associado a produção de intermediários de nitrogênio. Nas análises aqui realizadas, o tratamento com memantina ou 7-nitroindazol foi capaz de reduzir a expressão desses marcadores, que são largamente expressos durante a infecção com PbA. Ambas as drogas reduziram significativamente a expressão de NT-3, corroborando o fato de que a via de excitotoxicidade tem relevante atuação quanto ao estresse nitrosativo e que este fenômeno parece ter importância na contribuição dos eventos que levam ao dano cognitivo associados a malária cerebral experimental.

Ainda nesse contexto, também avaliamos a atividade da mieloperoxidase. A mieloperoxidase é uma heme-peroxidase presente nos grânulos intracelulares de fagócitos, que auxilia o sistema imune no combate a invasores e tem como um dos mecanismos de atuação a geração de espécies oxidantes (Davies,2011). No entanto, sítios inflamatórios têm sido associados com danos teciduais, de modo que estímulos nocivos podem levar essa enzima a gerar uma alta quantidade de espécies reativas, que levam a diversas injúrias, incluindo desordens neurodegenerativas (Davies,2011;

Ray and Katyal, 2016). Já foi observado que a atividade de MPO está aumentada durante o processo inflamatório associado a malária grave (Mohamed *et al.*, 1996). Isso também foi observado nas análises aqui obtidas. No presente trabalho, observamos também que o tratamento tanto com memantina como com 7-nitroindazol foi capaz de reverter o aumento da MPO, sugerindo uma possível modulação do processo neuroinflamatório estabelecido. Não se sabe exatamente como a inibição da via de excitotoxicidade poderia estar levando à diminuição da ativação de neutrófilos, os clássicos produtores de MPO, no entanto, a redução da ativação de cascatas pró-inflamatórias, discutidas anteriormente, certamente devem estar relacionadas a esse processo. A possível modulação da produção de eicosanóides durante a patogênese da doença poderia estar contribuindo com esse evento devido à produção de leucotrienos, especialmente do tipo B₄, que estão relacionados ao recrutamento e ativação de células imunológicas (Xiao *et al.*, 1999). De fato, já foi discutido o aumento da atividade de fosfolipase A₂ diante de injúrias cerebrais (Sapirstein *et al.*, 2000; Sun *et al.*, 2004). Outra possibilidade, e talvez a que melhor se encaixe no contexto desse estudo, se baseia no conhecimento recente de que a MPO não é uma enzima exclusiva de neutrófilos, sendo também produzida em macrófagos e micróglia ativadas, podendo ainda ser observada em astrócitos e neurônios em doenças que acometem o SNC (Chen *et al.*, 2020). Contudo, mais investigações são necessárias para confirmar esta hipótese.

Déficits neurológicos ocorrem em função da disfunção neuronal decorrente da neuroinflamação crônica característica de doenças neurodegenerativas (Chung *et al.*, 2015). Neste trabalho, proteína pré-sináptica sinaptofisina e proteína pós-sináptica PSD-95 foram avaliadas durante a malária cerebral experimental. A sinaptofisina é uma proteína de vesículas sinápticas presente em botões pré-sinápticos (Bai and Strong, 2014; Hu *et al.*, 2015). Além disso, é um marcador geral de sinapses, de modo que tem sido utilizada para medir confiavelmente a densidade sináptica (Hu *et al.*, 2015). Diversas patologias que acometem o sistema nervoso têm demonstrado redução na expressão dessa proteína (Bai and Strong, 2014; Hu *et al.*, 2015). Aqui, resultados similares foram encontrados através da infecção com PbA, apesar da diferença não ser significativa. A densidade pós-sináptica (PSD) consiste em uma rede de proteínas que interagem e que se organizam e estabilizam receptores sinápticos, canais iônicos, proteínas estruturais e moléculas de sinalização que participam da transmissão e função sináptica normal (Vallejo *et al.*, 2017). A proteína de densidade

pós-sináptica 95 (PSD-95) é um elemento importante das sinapses químicas e interage com receptores de glutamato, moléculas de adesão celular e elementos citoesqueléticos (Vallejo *et al.*,2017). É o elemento de ligação entre receptores NMDA e enzima nNOS através do domínio PDZ (Sommer *et al.*, 2017). O complexo NMDAR / PSD-95 / nNOS constitui um microambiente no qual o influxo de cálcio através de receptores NMDA ativa preferencialmente a nNOS via calmodulina, o que leva à formação de níveis neurotóxicos de NO quando os receptores NMDA são superestimulados devido a altas concentrações de glutamato extracelular, como discutido anteriormente (Lai *et al.*,2014; Sommer *et al.*,2017). Ambas as proteínas se mostram alteradas em neuropatologias (Xiao *et al.*,1999; Hu *et al.*,2015). Os dados deste estudo mostram que a enzima pós-sináptica PSD-95 sofre aumento de expressão durante a malária cerebral experimental, possivelmente favorecendo o processo de excitotoxicidade estabelecido. Além disso, foi demonstrado que o tratamento com inibidores de NMDA ou de nNOS, especialmente o 7-nitroindazol, parecem restaurar os níveis basais de expressão tanto de sinaptofisina quanto de PSD-95.

O processo de excitotoxicidade se caracteriza pela ativação de diferentes vias de morte celular no neurônio (Lai *et al.*,2014). Injúrias locais associadas a ativação crônica das células gliais, a inflamação local e a produção espécies reativas (ROS e RNS) no ambiente cerebral podem induzir essa sinalização deletéria (Bernhardi *et al.*, 2015). Neste trabalho, foi avaliado a morte neuronal por apoptose através da ativação das caspases associadas às vias extrínseca e intrínseca no modelo experimental de malária cerebral. A ativação de ambas as vias contribui com a perda de células neuronais associada às disfunções neurológicas observadas em doenças que se caracterizam, também, pela neurotoxicidade mediada por neurotransmissores (Henshall, 2007; Lai *et al.*,2014). A expressão de caspase-9 (via intrínseca), caspase-8 (via extrínseca) e de caspase-3 (efetora) clivada foi avaliada e mostrou-se reduzida no hipocampo de camundongos infectados com PbA submetidos ao tratamento com memantina ou 7-nitroindazol se comparados com o grupo infectado não tratado. Segundo estudos prévios, a sinalização de TNF, a ativação de JNK quinases e a disfunção mitocondrial são alguns eventos decorrentes da neurotoxicidade glutamatérgica que podem estar envolvidos na ativação da via extrínseca ou intrínseca, respectivamente (Clark *et al.*,2016; Fahrenthold *et al.*, 2018). O resultado obtido sugere que o bloqueio de NMDA extrassináptico e nNOS parece favorecer a sobrevivência

das células do sistema nervoso, possivelmente devido a diminuição de mediadores inflamatórios e espécies pró-oxidativas, o que foi observado previamente. No entanto, a análise de marcadores clássicos como p38 quinase ativada downstream à ativação de JNK quinase (Parsons *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2018), bem como citocromo c liberada da mitocôndria em casos de disfunção, por exemplo, precisa ainda ser investigado.

CONCLUSÃO:

Muitas doenças neurológicas compartilham mecanismos que levam a eventos de morte e degeneração e contribuem com a formação de sequelas que podem persistir ao longo de toda a vida do indivíduo (Benhardi *et al.*, 2015). A excitotoxicidade neuronal é uma via disparada em condições de injúria, sendo um evento comum em várias desordens que acometem o sistema nervoso central (Lai *et al.*, 2014; Binivignati *et al.*, 2020). Neste estudo, foi avaliada a participação da neurotoxicidade associada à ativação de receptores glutamatérgicos nos mecanismos envolvidos no estabelecimento de disfunções cognitivas durante a malária cerebral experimental. De acordo com os resultados obtidos neste projeto, foi demonstrado que:

- Apesar de não haver proteção quanto ao estabelecimento da malária grave, o tratamento com inibidor de receptores NMDA extrassinápticos e da enzima nNOS, duas proteínas centrais para a ocorrência do fenômeno de excitotoxicidade, mostrou-se promissor em prevenir as disfunções cognitivas observadas no modelo experimental de malária cerebral.
- A inibição farmacológica de receptores NMDA extrassinápticos e da enzima nNOS foi capaz de reduzir a expressão de marcadores envolvidos na ativação da via de excitotoxicidade neuronal.
- A inibição farmacológica de NMDA extrassináptico e da enzima nNOS reduziu a expressão de fatores neuroinflamatórios, como citocinas pró-inflamatórias, marcadores de ativação astrocítica e de espécies reativas observadas no curso da infecção. Além de reduzir a atividade de MPO.
- A inibição farmacológica de receptores NMDA extrassinápticos e da enzima nNOS reduziu a disfunção sináptica observada durante a malária cerebral experimental.
- A inibição farmacológica de receptores NMDA extrassinápticos e da enzima nNOS reduziu a ativação de vias de morte por apoptose durante a malária cerebral experimental.

Esses achados sugerem que terapias de interferência no processo de excitação glutamatérgica exacerbada possam ser promissoras na prevenção das sequelas cognitivas associadas à malária cerebral.

8. BIBLIOGRAFIA:

- Acosta C, Anderson HD, Anderson CM. **Astrocyte Dysfunction In Alzheimer Disease.** *J Neurosci Res.* 2017 Dec;95(12):2430-2447.
- Adukpo S, Kusi KA, Ofori MF, Tetteh JKA, Amoako-Sakyi D, Goka BQ, Adjei GO, Edoh DA, Akanmori BD, Gyan BA, Dodoo D. **High Plasma Levels of Soluble Intercellular Adhesion Molecule (ICAM)-1 Are Associated with Cerebral Malaria.** *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e84181
- Aggrey AA, Srivastava K, Ture S, Field DJ, Morrell CN. **Platelet induction of the acute-phase response is protective in murine experimental cerebral malaria.** *J Immunol.* 2013 May 1; 190(9):4685-91.
- Angchaisuksiri P. **Coagulopathy in Malaria.** *Thromb Res.* 2014 Jan;133(1):5-9.
- Anilkumar U, Weisova P, Schmid J, Bernas T, Huber HJ, Düssmann H, Connolly NMC, Prehn JHM. **Defining External Factors that Determine Neuronal Survival, Apoptosis and Necrosis during Excitotoxic Injury using a High Content Screening Imaging Platform.** *PLoS One.* 2017 Nov 16;12(11):e0188343
- Antinori S, Galimberti L, Milazzo L, Corbellino M. **Biology of human malaria plasmodia including Plasmodium knowlesi.** *Mediterr J. Hematol. Infect. Dis.* 2012.4:e2012013
- Armada-Moreira A, Gomes JI, Pina CC, Savchak OK, Gonçalves-Ribeiro J, Rei N, Pinto S, Morais TP, Martins RS, Ribeiro FF, Sebastião AM, Crunelli V, Vaz SH. **Going the Extra (Synaptic) Mile: Excitotoxicity as the Road Toward Neurodegenerative Diseases.** *Front Cell Neurosci.* 2020 Apr 24;14:90.
- Apinjoh TO, Anchang-Kimbi JK, Njua-Yafi C, Mugri RN, Ngwai AN, Rockett KA, Mbunwe E, Besingi RN, Clark TG, Dominic P, Kwiatkowski DP, Achidi EA. **Association of Cytokine and Toll-Like Receptor Gene Polymorphisms with Severe Malaria in Three Regions of Cameroon.** *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e8107

- Ashley EA, Pyae Phyo A, Woodrow CJ. **Malaria.** *Lancet.* 2018 Apr 21;391(10130):1608-1621
- Bai X, Strong R. **Expression of Synaptophysin Protein in Different Dopaminergic Cell Lines.** *J Biochem Pharmacol Res.* 2014 Dec;2(4):185-190.
- Ball HJ, MacDougall HG, McGregor IS, Hunt NH. **Cyclooxygenase-2 In The Pathogenesis of Murine Cerebral Malaria.** *J Infect Dis.* 2004 Feb 15;189(4):751-8
- Baltaci SB, Mogulkoc R, Baltaci AK. **Molecular Mechanisms of Early and Late LTP.** *Neurochem Res.* 2019 Feb;44(2):281-296
- Bangirana P, Musisi S, Boivin MJ, Ehnvall A, John CC, Bergemann TL, Allebeck P. **Malaria with neurological involvement in Ugandan children: effect on cognitive ability, academic achievement and behaviour.** *Malaria Journal* 2011, 10:334
- Bakiri Y, Hamilton NB, Káradóttir R, and Attwell D. **Testing NMDA receptor block as a therapeutic strategy for reducing ischaemic damage to CNS white matter.** *Glia.* Author manuscript; available in PMC 2010 May 4. Published in final edited form as: *Glia.* 2008 Jan 15; 56(2): 233–240.
- Barateiro A, Afonso V, Santos G, Cerqueira JJ, Brites D1, van Horssen J, Fernandes A. **S100B as a Potential Biomarker and Therapeutic Target in Multiple Sclerosis.** *Mol Neurobiol.* 2016 Aug;53(6):3976-3991.
- Basu S, Sahi PK. **Malaria: An Update.** *Indian J Pediatr.* 2017 Jul;84(7):521-528.
- Bentivoglio M, Mariotti R, Bertini G. **Neuroinflammation And Brain Infections: Historical Context And Current Perspectives.** *Brain Res Rev.* 2011 Jan 7;66(1-2):152-73.
- Bernhardi R, Bernhardi LE and Eugén J. **Microglial cell dysregulation in brain aging and neurodegeneration.** *Frontiers in Aging Neuroscience.* June 2015, Volume 7, Article 124
- Binvignat O, Olloquequi J. **Excitotoxicity as a Target Against Neurodegenerative Processes.** *Curr Pharm Des.* 2020;26(12):1251-1262.
- Bogdan C. **Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update.** *Trends Immunol.* 2015.

- Boivin MJ, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM and John CC. 2007. **Cognitive impairment after cerebral malaria in children: a prospective study.** *Pediatrics.* 119: e360-366.
- Breitzig M, Bhimineni C, Lockey R, Kolliputi N. **4-Hydroxy-2-Nonenal: A Critical Target In Oxidative Stress?** *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016 Oct 1;311(4):C537-C543.
- Brown GC. **Nitric oxide and neuronal death.** *Nitric Oxide.* 2010 Nov 1;23(3):153-65.
- Bruneel F. **Human cerebral malaria: 2019 mini review.** *Rev Neurol (Paris).* Sep-Oct 2019;175(7-8):445-450.
- Calderaro A, Piccolo P, Gorrini C, Rossi R, Montecchini S, Dell'Anna ML, Conto F, Medici MC, Chezzi C, Arcangeletti MC. **Accurate identification of the six human *Plasmodium* spp. causing imported malaria, including *Plasmodium ovale wallikeri* and *Plasmodium knowlesi*.** *Malaria Journal* 2013, 12:321
- Carter JA, Neville BJR, Newton CRJC. **Neuro-cognitive impairment following acquired central nervous system infections in childhood: a systematic review.** *Brain Research Reviews* 43 (2003) 57–69
- Center for Disease Control and Prevention. The History of Malaria, an Ancient Disease, 2015. <https://www.cdc.gov/malaria/about/history/index.html>
- Center for Disease Control and Prevention. Malaria, About Malaria, Disease, 2020. <https://www.cdc.gov/malaria/about/disease.html>
- Chamorro Á, Dirnagl U, Urra X, Planas AM. **Neuroprotection In Acute Stroke: Targeting Excitotoxicity, Oxidative And Nitrosative Stress And Inflammation.** *Lancet Neurol.* 2016 Jul;15(8):869-881.
- Chen SL, Tao PL, Chu CH, Chen SH, Wu HE, Tseng LF, Hong JS, Lu RB. **Low-Dose Memantine Attenuated Morphine Addictive Behavior Through Its Anti-Inflammation And Neurotrophic Effects In Rats.** *J Neuroimmune Pharmacol.* 2012 Jun;7(2):444-53
- Chen S, Chen H, Du Q and Shen J. **Targeting Myeloperoxidase (MPO) Mediated Oxidative Stress and Inflammation for Reducing Brain Ischemia Injury: Potential Application of Natural Compounds.** *Front Physiol.* 2020; 11: 433
- Choi DW. **Glutamate Neurotoxicity And Diseases Of The Nervous System.** *Neuron.* 1988 Oct;1(8):623-34

- Chung WS, Welsh CA, Barres BA, Stevens B. **Do Glia Drive Synaptic And Cognitive Impairment In Disease?** *Nat Neurosci.* 2015 Nov;18(11):1539-1545.
- Clark IA, Vissel B. **Excess Cerebral TNF Causing Glutamate Excitotoxicity Rationalizes Treatment Of Neurodegenerative Deseases And Neurogenic Pain By Anti-TNF Agents.** *J Neuroinflammation.* 2016 Sep 5;13(1):236.
- Cobb CA and Cole MP. **Oxidative and Nitrative Stress in Neurodegeneration.** *Neurobiol Dis.* 2015 Dec; 84: 4–21.
- Colucci-D'Amato L, Perrone-Capano C, di Porzio U. **Chronic Activation Of ERK And Neurodegenerative Diseases.** *Bioessays.* 2003 Nov;25(11):1085-95
- Combes V, Guillemin GJ, Chan-Ling T, Hunt NH, Grau GE. **The Crossroads of Neuroinflammation in Infectious Diseases: Endothelial Cells and Astrocytes.** *Trends Parasitol.* 2012 Aug;28(8):311-9
- Costa LG. **The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides.** *Handb Clin Neurol.* 2015; 131:135-48.
- Cox FE. **History of the discovery of the malaria parasites and their vectors.** *Parasit. Vectors* 2010 Feb 1;3(1):5
- Cox FE. **The Golden Age of parasitology-1875-1925: the Scottish contributions.** *Parasitology.* 2017 Oct;144(12):1567-1581.
- Cowman AF, Healer J, Marapana D and Marsh K. **Malaria: Biology and Disease.** *Cell* 167, October 20, 2016.
- Craig AG, Khairul MFM, Patil PR. **Cytoadherence and Severe Malaria.** *Malays J. Med. Sci.* Apr-Jun 2012; 19(2): 5-18
- Cromer D, Best SE, Engwerda C, Haque A, Davenport M. **Where Have All the Parasites Gone? Modelling Early Malaria Parasite Sequestration Dynamics.** *PLoS ONE* 8(2): e55961, 2013.
- Cunha CB. and Cunha BA. **Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler.** *J. Vector Borne Dis.* 2008.45:194-9.
- Dattoo MS, Natama MH, Somé A, Traoré O, Rouamba T, Bellamy D, Yameogo P, Valia D, Tegneri M, Ouedraogo F, Soma R, Sawadogo S, Sorgho F, Derra K, Rouamba E, Orindi B, Ramos Lopez F, Flaxman A, Cappuccini F, Kailath R, Elias S, Mukhopadhyay E, Noe A, Cairns M, Lawrie A, Roberts R, Valéa I, Sorgho H, Williams N, Glenn G, Fries L, Reimer J, Ewer KJ, Shaligram U, Hill AVS, Tinto H. **Efficacy of a low-dose candidate malaria vaccine, R21 in**

adjuvant Matrix-M, with seasonal administration to children in Burkina Faso: a randomised controlled trial. *Lancet.* 2021 May 15; 397(10287): 1809–1818.

Davies MJ. **Myeloperoxidase-derived oxidation: mechanisms of biological damage and its prevention.** *J. Clin. Biochem. Nutr.* 2011 Jan; 48(1):8-19

de Alvarenga DAM, Culleton R, de Pina-Costa A, Rodrigues DF, Bianco C Jr, Silva S, Nunes AJD, de Souza JC Jr, Hirano ZMB, Moreira SB, Pissinatti A, de Abreu FVS, Lisboa Areas AL, Lourenço-de-Oliveira R, Zalis MG, Ferreira-da-Cruz MF, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CFA. **An assay for the identification of Plasmodium simium infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest.** *Sci Rep.* 2018 Jan 8;8(1):86. doi: 10.1038/s41598-017-18216-x.

deAlvarenga DAM, de Pina-Costa A, de Sousa TN, Pissinatti A, Zalis MG, Suárez-Mutis MC, Lourenço-de-Oliveira R, Brasil P, Daniel-Ribeiro CT, de Brito CFA. **Simian malaria in the Brazilian Atlantic forest: first description of natural infection of capuchin monkeys (Cebinae subfamily) by Plasmodium simium.** *Malar J.* 2015 Feb 18;14:81. doi: 10.1186/s12936-015-0606-6

Delhaye J, Jenkins T, and Christe P. **Plasmodium infection and oxidative status in breeding great tits, Parus major.** *Malar J.* 2016; 15: 531

de Miranda AS, Brant F, Vieira LB, Rocha NP, Vieira ÉLM, Rezende GHS, de Oliveira Pimentel PM, Moraes MFD, Ribeiro FM, Ransohoff RM, Teixeira MM, Machado FS, Rachid MA, Teixeira AL. **A Neuroprotective Effect Of The Glutamate Receptor Antagonist MK801 On Long-Term Cognitive And Behavioral Outcomes Secondary To Experimental Cerebral Malaria.** *Mol Neurobiol.* 2017 Nov;54(9):7063-7082.

Desruisseaux MS, Gulinello M, Smith DN, Lee SC, Tsuji M, Weiss LM, Spray DC, Tanowitz HB. **Cognitive Dysfunction in Mice Infected with Plasmodium berghei Strain ANKA.** *The Journal of Infectious Diseases* 2008; 197:1621–7

Donato R, Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, Bianchi R, Brozzi F, Tubaro C, Giambanco I. **S100B's Double Life: Intracellular Regulator And Extracellular Signal.** *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jun;1793(6):1008-22.

Dorovini-Zis K, Schmidt K, Huynh H, Fu W, Whitten RO, Milner D, Kamiza S, Molyneux M, Taylor TE. **The Neuropathology of Fatal Cerebral Malaria in Malawian Children.** *The American Journal of Pathology, Vol. 178, No. 5, May 2011*

- Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. **Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2017 Jul 20;7:324.
- Esposito Z, Belli L, Toniolo S, Sancesario G, Bianconi C, Martorana A. **Amyloid beta, glutamate, excitotoxicity in Alzheimer's disease: are we on the right track?** *CNS Neurosci Ther.* 2013 Aug;19(8):549-55
- Fahrenthold BK, Fernandes KA, Libby RT. **Assessment of Intrinsic and Extrinsic Signaling Pathway in Excitotoxic Retinal Ganglion Cell Death** *Sci Rep.* 2018 Mar 15;8(1):4641.
- Fanselow MS. **Conditioned and unconditional components of post-shock freezing.** *Pavlov J Biol Sci.* Oct-Dec 1980;15(4):177-82.
- Farley A, Johnstone C, Hendry C, McLafferty E. **Nervous System: part 1.** *Nurs Stand.* 2014 Apr 2-8;28(31):46-51.
- Fatih FA, Siner A, Ahmed A, Woon LC, Craig AG, Singh B, Krishna S, Cox-Singh J. **Cytoadherence and virulence - the case of Plasmodium knowlesi malaria.** *Malaria Journal* 11:33, 2010
- Fernando SD, Rodrigo C, Rajapakse S. **The 'hidden' burden of malaria: cognitive impairment following infection.** *Malaria Journal* 2010, 9:366
- Franklin BS, Ishizakac ST, Lamphier M, Gusovsky F, Hansen H, Rose J, Zheng W, Ataíde MA, Oliveira RB, Golenbock DT, Gazzinell RT. **Therapeutical targeting of nucleic acid-sensing Toll-like receptors prevents experimental cerebral malária.** *PNAS | March 1, 2011 | vol. 108 | no. 9 | 3689-3694*
- Franklin BS, Parrocheb P, Ataídea MA, Lauwb F, Roperta C, Oliveira RBO, Pereira D, Tadaç MS, Nogueira P, Silva LHP, Bjorkbackad H, Golenbocka DT, Gazzinellia RT. **Malaria primes the innate immune response due to interferon- γ induced enhancement of toll-like receptor expression and function.** *PNAS, April 7, 2009 vol. 106 no. 14 5789-5794*
- Garthwaite J. **NO as a Multimodal Transmitter in The Brain: Discovery And Current Status.** *Br J Pharmacol.* 2019 Jan;176(2):197-211.
- Garwood CJ, Ratcliffe LE, Simpson JE, Heath PR, Ince PG, Wharton SB. **Review: Astrocytes In Alzheimer's Disease And Other Age-Associated Dementias: A Supporting Player With A Central Role.** *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2017 Jun;43(4):281-298.

- Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. **Innate sensing of malaria parasites.** *Nat Rev Immunol.* 2014 Nov; 14(11):744-57
- Gerlai R, Roder J. **Abnormal Exploratory Behavior in Transgenic Mice Carrying Multiple Copies of The Human Gene for S100 Beta.** *J Psychiatry Neurosci.* 1995 Mar;20 (2):105-12.
- Ghazanfari N, Mueller SN, Heath WR. **Cerebral Malaria in Mouse and Man.** *Front Immunol.* 2018 Sep 10;9:2016.
- Giacobbo BL, de Freitas BS, Vedovelli K, Schlemmer LM, Pires VN, Antoniazzi V, Santos CSD, Paludo L, Borges JV, de Lima DB, Schröder N, de Vries EFJ, Bromberg E. **Long-Term Environmental Modifications Affect BDNF Concentrations in Rat Hippocampus, But Not in Serum.** *Behav Brain Res.* 2019 Oct 17;372:111965
- Greenhalgh AD, David S, Bennett FC. **Immune Cell Regulation of Glia during CNS Injury and Disease.** *Nat Rev Neurosci.* 2020 Mar;21(3):139-152.
- Griffing SM, Tauil PL, Udhayakumar V, Silva-Flannery L. **A historical perspective on malaria control in Brazil.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015 Sep; 110 (6):701-18
- Gonzalez MC, Radiske A, Cammarota M. **On the Involvement of BDNF Signaling in Memory Reconsolidation.** *Front Cell Neurosci.* 2019 Aug 22;13:383.
- Goode TD, Tanaka KZ, Sahay A, McHugh TJ. **An Integrated Index: Engrams, Place Cells, and Hippocampal Memory.** *Neuron.* 2020 Sep 9;107(5):805-820.
- Guerra MC, Tortorelli LS, Galland F, Da Ré C, Negri E, Engelke DS, Rodrigues L, Leite MC, Gonçalves CA. **Lipopolysaccharide Modulates Astrocytic S100B Secretion: A Study in Cerebrospinalfluid and Astrocyte Cultures from Rats.** *J Neuroinflammation.* 2011 Oct 4;8:128. doi: 10.1186/1742-2094-8-128.
- Guimarães RM, Asmus CI, Meyer A. **DDT reintroduction for malaria control: the cost-benefit debate for public health.** *Cad Saude Publica.* 2007 Dec; 23(12):2835-44
- Gun SY, Claser C, Tan KSW, and Rénia L . **Interferons and Interferon Regulatory Factors in Malaria.** *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 243713. Gupta H, Dhunputh P, Bhatt AN, Satyamoorthy K, Umakanth S. **Cerebral malaria in a man with Plasmodium vivax mono-infection: a case report.** *Trop Doct.* 2016 Oct; 46(4):241-245. Epub 2016 Jan 8

- Hanboonkunupakarn B, White NJ. **Advances and Roadblocks in the Treatment of Malaria.** *Br J Clin Pharmacol.* 2020 Jul 12.
- Hannibal L. **Nitric Oxide Homeostasis in Neurodegenerative Diseases.** *Curr Alzheimer Res.* 2016;13(2):135-49.
- Hansen DS. **Inflammatory Responses Associated with the Induction of Cerebral Malaria: Lessons from Experimental Murine Models.** *PLoS Pathog,* 2012, 8(12): e1003045
- Hardingham GE, Fukunaga Y, Bading H. **Extrasynaptic NMDARs Oppose Synaptic Nmdars By Triggering CREB Shut-Off And Cell Death Pathways.** *Nat Neurosci.* 2002 May;5(5):405-14.
- Hemingway J. **The role of vector control in stopping the transmission of malaria: threats and opportunities.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 May 12; 369(1645):20130431
- Heneka MT, Kummer MP, Latz E. **Innate immune activation in neurodegenerative disease.** *Nat Rev Immunol.* 2014 Jul; 14(7):463-77
- Henshall DC. **Apoptosis Signalling Pathways in Seizure-Induced Neuronal Death and Epilepsy.** *Biochem Soc Trans.* 2007 Apr;35(Pt 2):421-3.
- Hogan AB, Winskill P, Ghani AC. **Estimated impact of RTS,S/AS01 malaria vaccine allocation strategies in sub-Saharan Africa: A modelling study.** *PLoS Med.* 2020 Nov 30;17(11):e1003377.
- Hogan-Cann AD, Anderson CM. **Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors.** *Trends Pharmacol Sci.* 2016 Sep;37(9):750-767.
- Hora R, Kapoor P, Thind KK, Mishra PC. **Cerebral Malaria--Clinical Manifestations and Pathogenesis.** *Metab Brain Dis.* 2016 Apr;31(2):225-37.
- Hu W, MacDonald ML, Elswick DE, Sweet RA. **The Glutamate Hypothesis of Schizophrenia: Evidence from Human Brain Tissue Studies.** *Ann N Y Acad Sci.* 2015Mar; 1338:38-57.
- Huggins MA, Johnson HL, Jin F, Songo AN, Hanson LM, LaFrance SJ, Butler NS, Hartly JT, Johnson AJ. **Perforin Expression by CD8 T Cells Is Sufficient To Cause Fatal Brain Edema during Experimental Cerebral Malaria.** *Infect Immun.* 2017 Apr 21;85(5):e00985-16.
- Hugo J, Ganguli M. **Dementia And Cognitive Impairment: Epidemiology, Diagnosis, And Treatment.** *Clin Geriatr Med.* 2014 Aug; 30(3):421-42.

- Hunt NH, Ball HJ, Hansen AM, Khaw LT, Guo J, Bakmiwewa S, Mitchell AJ, Combes V, Grau GE. **Cerebral malaria: gamma-interferon redux.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Aug 15; 4:113
- Idro R, Marsh K, John CC, Newton CRJ. **Cerebral Malaria; Mechanisms Of Brain Injury And Strategies for Improved Neuro-Cognitive Outcome.** *Pediatr. Res.* 2010; 68(4): 267–274.
- Idro R, Kakooza-Mwesige A, Balyejjussa S, Mirembe G, Mugasha C, Tugumisirize J, Byarugaba J. **Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children.** *BMC Research Notes* 2010, **3**: 104
- Idro R, Kakooza-Mwesige A, Asea B, Ssebyala K, Bangirana P, Opoka RO, Lubowa SK, Semrud-Clikeman M, John CC, Nalugya J. **Cerebral malaria is associated with long-term mental health disorders: a cross sectional survey of a long-term cohort.** *Malar J.* 2016 Mar 31; 15(1):184.
- Iovino L, Tremblay ME, Civiero L. **Glutamate-induced Excitotoxicity in Parkinson's Disease: The Role of Glial Cells.** *J Pharmacol Sci.* 2020 Nov;144(3):151-164.
- Isah MB and Ibrahim MA. **The role of antioxidants treatment on the pathogenesis of malarial infections: a review.** *Parasitol Res* (2014) 113:801–809
- Islam BU, Habib S, Ahmad P, Allarakha S, Moinuddin, Ali A. **Pathophysiological Role of Peroxynitrite Induced DNA Damage in Human Diseases: A Special Focus on Poly(ADP-ribose) Polymerase (PARP).** *Indian J Clin Biochem.* 2015 Oct; 30(4):368-85. doi: 10.1007/s12291-014-0475-8. Epub 2015 Jan 20.
- Itoh N, Enomoto A, Nagai T, Takahashi M, Yamada K. **Molecular mechanism linking BDNF/TrkB signaling with the NMDA receptor in memory: the role of Girdin in the CNS.** *Rev Neurosci.* 2016 Jul 1;27(5):481-90.
- Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, De Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. **Mechanisms for memory types differ.** *Nature* 393:635-6, 1998
- Izquierdo I. **Memória.** *Artimed editor* (2002). *Reimpressão*, 2008
- Izquierdo I, Cammarota M, Da Silva WC, Bevilaqua LRM, Rossato JI, Bonini JS, Mello P, Beneti F, Costa JC, Medina JH. **The evidence for hippocampal long-term potentiation as a basis of memory for simple tasks.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências* (2008) 80(1): 115-127

- Izquierdo I, Bevilaqua LR, Rossato JI, Bonini JS, Medina JH, Cammarota M. **Different molecular cascades in different sites of the brain control memory consolidation.** *Trends Neurosci.* 2006 Sep; 29(9):496-505
- Izquierdo I, Medina JH. **Memory Formation: The Sequence of Biochemical Events in the Hippocampus and Its Connection to Activity in Other Brain Structures.** *NEUROBIOLOGY OF LEARNING AND MEMORY* 68, 285–316 (1997).
- Izquierdo IA, Myskiw JC, Benetti F, Furini CRG. **Memória: tipos e mecanismos – achados recentes.** *REVISTA USP/São Paulo, n. 98, p. 9-16 • JUNHO/JULHO/agosto 2013.*
- Izquierdo I, Furini CR, Myskiw JC. **Fear Memory.** *Physiol Rev.* 2016 Apr; 96(2):695-750.
- John CC, Kutamba E, Mugarura K, Opoka RO. **Adjunctive therapy for cerebral malaria and other severe forms of Plasmodium falciparum malaria.** *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Sep;8(9):997-1008.
- Katche C, Cammarota M, Medina JH. **Molecular signatures and mechanisms of long-lasting memory consolidation and storage.** *Neurobiol Learn Mem.* 2013 Nov; 106:40-7
- Kikuchi T. **Is Memantine Effective as an NMDA Receptor Antagonist in Adjunctive Therapy for Schizophrenia?** *Biomolecules.* 2020 Aug; 10(8): 1134
- Kim GH, Kim JE, Rhie SJ, Yoon S. **The Role of Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases.** *Exp Neurobiol.* 2015 Dec; 24(4):325-40
- Kinra P, Dutta V. **Serum TNF alpha levels: a prognostic marker for assessment of severity of malaria.** *Trop Biomed.* 2013 Dec; 30(4):645-53
- Kirchhoff C, Buhmann S, Braunstein V, Leidel BA, Vogel T, Kreimeier U, Mutschler W, Biberthaler P. **Cerebrospinal S100-B: A Potential Marker For Progressive Intracranial Hemorrhage In Patients With Severe Traumatic Brain Injury.** *Eur J Med Res.* 2008 Nov 24;13(11):511-6..
- Kuhn DM1, Sakowski SA, Sadidi M, Geddes TJ. **Nitrotyrosine as a marker for peroxynitrite-induced neurotoxicity: the beginning or the end of the end of dopamine neurons?** *J Neurochem.* 2004 May;89(3):529-36.

- Kuzmina US, Zainullina LF, Vakhitov VA, Bakhtiyarova KZ, Vakhitova YV. **The Role of Glutamate in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis.** *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova.* 2019;119(8):160-167.
- Lai TW, Zhang S, Wang YT. **Excitotoxicity and stroke: identifying novel targets for neuroprotection** *Prog Neurobiol.* 2014 Apr; 115: 157-88.
- Langfitt JT, McDermott MP, Brim R, Mboma S, Potchen MJ, Kampondeni SD, Seydel KB, Semrud-Clikeman M, Taylor TE. **Neurodevelopmental Impairments 1 Year After Cerebral Malaria.** *Pediatrics.* 2019 Feb;143(2):e20181026.
- LeBlanc AC. **The Role Of Apoptotic Pathways In Alzheimer's Disease Neurodegeneration And Cell Death.** *Curr Alzheimer Res.* 2005 Oct;2(4):389-402.
- Lécuyer MA, Kebir H, Prat A. **Glial Influences on BBB Functions and Molecular Players in Immune Cell Trafficking.** *Biochim Biophys Acta.* 2016 Mar;1862(3):472-82.
- Lewerenz J, Maher P. **Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases-What is the Evidence?** *Front Neurosci.* 2015 Dec 16;9:469.
- Li T, Luo Z, Liu Y, Wang M, Yu X, Cao C, Liao Z, Ding Y, Yue S. **Excessive Activation of NMDA Receptors Induced Neurodevelopmental Brain Damage Cognitive.** *Neurochem Res.* 2018 Mar;43(3):566-580
- Lisman J, Cooper K, Sehgal M, Silva AJ. **Memory Formation Depends on Both Synapse-Specific Modifications of Synaptic Strength and Cell-Specific Increases in Excitability.** *Nat Neurosci.* 2018 Mar;21(3):309-314.
- Lovinger DM. **Communication Networks in the Brain: Neurons, Receptors, Neurotransmitters, and Alcohol.** *Alcohol Res Health.* 2008;31(3):196-214.
- Luzolo AL, Ngoyi DM. **Cerebral malaria.** *Brain Res Bull.* 2019 Feb; 145:53-58.
- McShane R, Westby MJ, Roberts E, Minakaran N, Schneider L, Farrimond LE, Maayan N, Ware J, Debarros J. **Memantine for dementia.** *Cochrane Database Syst Rev.* 2019 Mar 20;3(3):CD003154.
- McQueen PG, Williamson KC, and McKenzie FE. **Host immune constraints on malaria transmission: insights from population biology of within-host parasites.** *Malar J.* 2013; 12: 206.

- Maiti P, Singh SB, Ilavazhagan G. **Nitric oxide system is involved in hypobaric hypoxia-induced oxidative stress in rat brain.** *Acta Histochem.* 2009 May 8
- Majori G. **Short history of malaria and its eradication in Italy with short notes on the fight against the infection in the mediterranean basin.** *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012.4: e2012016..
- Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux ME, MacLennan CA. **Cytokine Profiles In Malawian Children Presenting With Uncomplicated Malaria, Severe Malarial Anemia, And Cerebral Malaria.** *Clin Vaccine Immunol.* 2017 Apr 5;24 (4).
- Mander P and Brown CG. **Activation of microglial NADPH oxidase is synergistic with glial iNOS expression in inducing neuronal death: a dual-key mechanism of inflammatory neurodegeneration.** *Journal of Neuroinflammation* 2005, 2:20
- Martins YC, Werneck GL, Carvalho LJ, Silva BP, Andrade BG, Souza TM, Souza D O, Daniel-Ribeiro CT. **Algorithms to predict cerebral malaria in murine models using the SHIRPA protocol.** *Malar J.* 2010 Mar 24; 9:85.
- Matuschewski K. **Murine infection models for vaccine development: The malaria example.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics* 9:3, 450–456; 2013 Landes Bioscience.
- Medana IM, Idro R, Newton CR. **Axonal and Astrocyte Injury Markers in The Cerebrospinal Fluid of Kenyan Children With Severe Malaria.** *J Neurol Sci.* 2007 Jul 15;258(1-2):93-8. Epub 2007 Apr 24.
- Mehta A, Prabhakar M, Kumar P, Deshmukh R, Sharma PL. **Excitotoxicity: bridge to various triggers in neurodegenerative disorders.** *Eur J Pharmacol.* 2013 Jan 5;698(1-3):6-18
- Middeldorp J, Hol EM. **GFAP In Health And Disease.** *Prog Neurobiol.* 2011 Mar;93(3):421-43.
- Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. **The pathogenic basis of malaria.** *Nature* 2002.415:673-9.
- Miller LH, Ackerman HC, Xin-zhuan Su XZ, and Wellems TE. **Malaria biology and disease pathogenesis: insights for new treatments.** *Nat Med.* 2013 Feb; 19(2): 156–167.

- Miranda AS, Vieira LB, Lacerda-Queiroz N, Souza AH, Rodrigues DH, Vilela MC, Gomez MV, Machado FS, Rachid MA, Teixeira AL. **Increased Levels of Glutamate in The Central Nervous System are Associated With Behavioral Symptoms in Experimental Malaria.** *Braz J Med Biol Res.* 2010 Dec;43(12):1173-7
- Mishra SK e Newton CRJC. **Diagnosis and management of the neurological complications of falciparum malária.** *Nat. Rev. Neurol.* 2009 April; 5(4): 189 –198.
- Misra S, Kuhad A, Chopra K. **Neurobiological Effect Of 7-Nitroindazole, A Neuronal Nitric Oxide Synthase Inhibitor, In Experimental Paradigm Of Alzheimer's Disease.** *Indian J Exp Biol.* 2013 Dec;51(12):1086-93.
- Mohamed AO, Elbashir MI, Ibrahim G, Ismail M, Venge P. **Neutrophil Leucocyte Activation in Severe Malaria.** *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1996 May-Jun;90(3):277.
- Morris R. **Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat.** *J Neurosci Methods.* 1984 May;11(1):47-60.
- Moxon CA, Gibbins MP, McGuinness D, Milner DA Jr, Marti M. **New Insights into Malaria Pathogenesis.** *Annu Rev Pathol.* 2020 Jan 24;15:315-343.
- Nakamura T, Lipton SA. **Preventing Ca⁺²- Mediated Nitrosative Stress In Neurodegenerative Deseases: Possible Pharmacological Strategies.** *Cell Calcium.* 2010 Feb;47(2):190-7
- Nilsson SK, Childs LM, Buckee C, Marti M. **Targeting Human Transmission Biology for Malaria Elimination.** *PLoS Pathog.* 2015.
- Nishanth G, Schlüter D. **Blood-Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention.** *Trends Parasitol.* 2019 Jul;35(7):516-528.
- Oates JC e Gilkeson GS. **The biology of nitric oxide and other reactive intermediates in systemic lupus erythematosus.** *Clinical Immunology (2006)* 121, 243—250
- O'Dell TJ, Hawkins RD, Kandel ER, Arancio O. **Tests of the roles of two diffusible substances in long-term potentiation: evidence for nitric oxide as a possible early retrograde messenger.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991
- Okun E, Griffioen KJ, Lathia JD, Tang SC, Mattson MP, Arumugam TV. **Toll-Like Receptors In Neurodegeneration.** *Brain Res Rev.* 2009; 59:278–292.

- Olloquequi J, Cornejo-Córdova E, Verdaguer E, Soriano FX, Binivignat O, Auladell C, Camins A. **Excitotoxicity in the pathogenesis of neurological and psychiatric disorders: Therapeutic implications.** *J Psychopharmacol.* 2018 Mar;32(3):265-275.
- Olmos G, Lladó J. **Tumor Necrosis Factor Alpha: A Link Between Neuroinflammation and Excitotoxicity.** *Mediators Inflamm.* 2014;2014:861231.
- Olney JW (1969) **Brain Lesions, Obesity, And Other Disturbances In Mice Treated With Monosodium Glutamate.** *Science* 164:719–721
- Olivares D, Deshpande VK, Shi Y, Lahiri DK, Greig NH, Rogers JT, Huang X. **N-Methyl D-Aspartate (NMDA) Receptor Antagonists And Memantine Treatment For Alzheimer’s Disease, Vascular Dementia And Parkinson’s Disease.** *Curr Alzheimer Res.* 2012 Jul;9 (6):746-58.
- Oluwayemi IO, Brown BJ, Oyedeji OA, Oluwayemi MA. **Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria.** *Pan African Medical Journal.* 2013; 15:88.
- Orellana JA, Froger N, Ezan P, Jiang JX, Bennett MVL, Naus CC, Giaume C, Sáez JC. **ATP and glutamate released via astroglial connexin 43 hemichannels mediate neuronal death through activation of pannexin 1 hemichannels.** *J Neurochem.* 2011 Sep;118(5):826-40.
- Orellana JA, von Bernhardi R, Giaume C, Sáez JC. **Glial hemichannels and their involvement in aging and neurodegenerative diseases.** *Rev Neurosci.* 2012 Jan 26;23(2):163-77.
- Organizaçao Mundial de Saúde. **World Malaria Report.** *Global Malaria Programme World Health Organization, 2020*
- Ovsepian SV. **The Birth of the Synapse.** *Brain Struct Funct.* 2017.
- Parsons MP, Raymond LA. **Extrasynaptic NMDA Receptor Involvement in Central Nervous System Disorders.** *Neuron.* 2014 Apr 16;82(2):279-93.
- Pacher P., Szabó C. **Role of poly (ADP-ribose) polymerase 1 (PARP-1) incardiovascular diseases: the therapeutic potential of PARP inhibitors.** *Cardiovasc Drug Rev.* 2007 Fall;25(3):235-60.

- Paoletti P, Bellone C, Zhou Q. **NMDA Receptor Subunit Diversity: Impact On Receptor Properties, Synaptic Plasticity And Disease.** *Nat Rev Neurosci.* 2013 Jun;14(6):383-400
- Papouin T, Oliet SH. **Organization, Control And Function Of Extrasynaptic NMDA Receptors.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2014 Oct 19;369(1654):20130601
- Pekny M1, Nilsson M. **Astrocyte Activation And Reactive Gliosis.** *Glia.* 2005 Jun;50(4):427-34.
- Percário S, Moreira DR, Gomes BAQ, Ferreira MES, Gonçalves ACM, Laurindo PSOC, Vilhena TC, Dolabela MF, Green MD. **Oxidative Stress in Malaria.** *Int. J.Mol. Sci.* 2012, 13, 16346-16372
- Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. **Malaria.** *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Aug 3;3:17050.
- Pino P, Vouldoukis I, Dugas N, Hassani-Loppion G, Dugas B, Mazier D. **Redox-dependent apoptosis in human endothelial cells after adhesion of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes.** *Ann NY Acad Sci.* 2003 Dec; 1010:582-586
- Ponsford MJ, Medana IM, Prapansilp P, Hien TT, Lee SJ, Dondorp AM, Esiri MM, Day NPJ, White NJ, Turner GDH. **Sequestration and Microvascular Congestion Are Associated With Coma in Human Cerebral Malaria.** *JID* 2012;205 (15 February). 663
- Portera-Cailliau C, Price DL, Martin LJ. **Excitotoxic Neuronal Death in the Immature Brain is an Apoptosis-Necrosis Morphological Continuum.** *J Comp Neurol.* 1997 Feb 3;378(1):70-87.
- Pradhan V and Ghosh K. **Immunological disturbances associated with malarial infection.** *J Parasit Dis (Jan-June 2013)* 37(1):11–15
- Prolo C, Álvarez MN, and Radi R. **Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens.** *Biofactors.* 2014 March; 40(2): 215–225
- Punsawad C, Maneerat Y, Chaisri U, Nantavisai K, Viriyavejakul P. **Nuclear factor kappa B modulates apoptosis in the brain endothelial cells and in travascular leukocytes of fatal cerebral malaria.** *Malar J.* 2013 Jul 26;12:260.

- Quintero JP, Siqueira AM, Tobón A, Blair S, Moreno A, Arévalo-Herrera M, Lacerda MVL, Valencia SH. **Malaria-related anaemia: a Latin American.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 106(Suppl. I): 91-104, 2011*
- Radi R. **Peroxynitrite, a Stealthy Biological Oxidant.** *J. Biol. Chem.* 2013, 288:2 6464-26472.
- Radi R. **Oxygen Radicals, Nitric Oxide, and Peroxynitrite: Redox Pathways in Molecular Medicine.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2018 Jun 5;115(23):5839-5848
- Rahimi BA, Thakkinstian A, White NJ, Sirivichayakul C, Dondorp AM, Chokejindachai W. **Severe vivax malaria: a systematic review and meta-analysis of clinical studies since 1900.** *Malar J.* 2014 Dec 8; 13:481
- Rahman MM. **Insecticide substitutes for DDT to control mosquitoes may be causes of several diseases.** *Environ Sci Pollut Res Int.* 2013 Apr; 20(4):2064-9
- Ray RS, Katyal A. **Myeloperoxidase: Bridging the gap in neurodegeneration.** *Neurosci Biobehav Rev.* 2016
- Rénia L, Howland SW, Claser C, Gruner AC, Suwanarusk R, Teo TH, Russell B, Ng LFP. **Cerebral malária: Mysteries at the blood-brain barrier.** *Landes Bioscience, 2012, 193–201*
- Reis PA, Comim CM, Hermani FV, Silva BR, Barichello T, Sab IM, Frutuoso VS, Bozza PT, Dal-Pizzol F, Zimmerman GA, Quevedo J, Castro-Faria-Neto HC. **Cognitive impairment after cerebral malaria in chloroquine treated mice is reversed by antioxidant adjuvant therapy.** *PLoS Pathog.* 2010 Jun 24;6 (6):e1000963
- Reis PA, Estado V, Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, Bozza PT, Bozza FA, Tibiriçá EV, Zimmerman GA, Castro-Faria-Neto HC. **Statins Decrease Neuroinflammation and Prevent Cognitive Impairment after Cerebral Malaria.** *PLoS Pathog, 2012,8(12): e1003099*
- Reis PA, Alexandre PC, D'Avila JC, Siqueira LD, Antunes B, Estado V, Tibiriçá EV, Verdonk F, Sharshar T, Chrétien F, Castro-Faria-Neto HC, Bozza FA. **Statins prevent cognitive impairment after sepsis by reverting neuroinflammation, and microcirculatory/endothelial dysfunction.** *Brain Behav Immun.* 2017 Feb; 60:293-303

- Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, Hafezparast M, Latcham J, Robinson TL, Quilter CA, Fisher EM. **SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice.** *Neurosci Lett.* 2001 Jun 22;306(1-2):89-92
- Rossati A, Bargiacchi O, Kroumova V, Zaramella M, Caputo A, Garavelli PL. **Climate, environment and transmission of malaria.** *Infez Med.* 2016 Jun 1; 24(2):93104
- Sahu U, Sahoo PK, Kar SK, Mohapatra BN, Ranjit M. **Association of TNF level with production of circulating cellular microparticles during clinical manifestation of human cerebral malaria** *Hum Immunol.* 2013 Jun; 74(6):713-21
- Sapirstein A, Bonventre JV. **Phospholipases A2 in ischemic and toxic brain injury.** *Neurochem Res.* 2000 May;25(5):745-53
- Sattler R, Tymianski M. **Molecular Mechanisms Of Glutamate Receptor-Mediated Excitotoxic Neuronal Cell Death.** *Mol Neurobiol.* 2001 Aug-Dec;24(1-3):107-29
- Schiess N, Villabona-Rueda A, Cottier KE, Huether K, Chipeta J, Stins MF. **Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria.** *Malar J.* 2020 Jul 23;19(1):266.
- Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico Malária, 2020.**
- Shabani E, Ouma BJ, Idro R, Bangirana P, Opoka RO, Park GS, Conroy AL, John CC. **Elevated Cerebrospinal Fluid Tumour Necrosis Factor Is Associated With Acute And Long-Term Neurocognitive Impairment In Cerebral Malaria.** *Parasite Immunol.* 2017 Jul;39 (7);
- Sheng JG, Mrak RE, Griffin WS. **S100 Beta Protein Expression In Alzheimer Disease: Potential Role In The Pathogenesis Of Neuritic Plaques.** *J Neurosci Res.* 1994 Nov 1;39 (4):398-404.
- Shrivastava SK, Dalko E, Delcroix-Genete D, Herbert F, Cazenave PA, Pied S. **Uptake of parasite-derived vesicles by astrocytes and microglial phagocytosis of infected erythrocytes may drive neuroinflammation in cerebral malaria.** *Glia.* 2017 Jan; 65(1):75-92.

- Singh R, Kumar R, Rana SK, Thakur B, Singh SPA. **Comparative Study of Clinical Profiles of Vivax and Falciparum Malaria in Children at a Tertiary Care Centre in Uttarakhand.** *J. Clin. Diagn. Res.*, 2013; 7(10): 2234–2237.
- Shastri A, Bonifati DM and Kishore U. **Innate Immunity and Neuroinflammation.** *Mediators Inflamm.* 2013; 2013: 342931.
- Shikani HJ, Freeman BD, Lisanti MP, Weiss LM, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. **Cerebral Malaria: We Have Come a Long Way.** *The American Journal of Pathology*, Vol. 181, No. 5, November 2012
- Sochocka M, Diniz BS, Leszek J. **Inflammatory Response in the CNS: Friend or Foe?** *Mol Neurobiol.* 2016 Nov 26
- Sofroniew MV and Harry V. Vinters HV. **Astrocytes: biology and pathology.** *Acta Neurophatol.* 2010 Jan; 119(1): 7-35
- Sommer JB, Bach A, Malá H, Strømgaard K, Mogensen J, Pickering DS. **In Vitro And in Vivo Effects of a Novel Dimeric Inhibitor of PSD-95 on Excitotoxicity and Functional Recovery After Experimental Traumatic Brain Injury.** *Eur J Neurosci.* 2017 Jan;45(2):238-248
- Souza MC, Padua TA and Henriques MG. **Endothelial-Leukocyte Interaction in Severe Malaria: Beyond the Brain.** *Mediators Inflamm.* 2015; 2015: 168937
- Soya S, Shoji H, Hasegawa E, Hondo M, Miyakawa T, Yanagisawa M, Mieda M, Sakurai T. **Orexin Receptor-1 in the Locus Coeruleus Plays an Important Role in Cue-Dependent Fear Memory Consolidation.** *The Journal of Neuroscience*, September 4, 2013 • 33(36):14549–14557 • **14549**
- Storm J, Craig AG. **Pathogenesis of cerebral malaria-inflammation and cytoadherence.** *Front Cell Infect Microbiol.* 2014 Jul 29; 4:100
- Sun GY, Xu J, Jensen MD, Simonyi A. **Phospholipase A2 in the central nervous system: implications for neurodegenerative diseases.** *J Lipid Res.* 2004 Feb;45(2):205-13.
- Swanson PA 2nd, Hart GT, Russo MV, Nayak D, Yazew T, Peña M, Khan SM, Janse CJ, Pierce SK, McGavern DB. **CD8+ T Cells Induce Fatal Brainstem Pathology during Cerebral Malaria via Luminal Antigen-Specific Engagement of Brain Vasculature.** *PLoS Pathog.* 2016 Dec 1;12(12):e1006022.

- Sweatt JD. **Neural plasticity and behavior - sixty years of conceptual advances.** *J Neurochem.* 2016 Oct; 139 Suppl 2:179-199
- Tabrizian K, Najafi S, Belaran M, Hosseini-Sharifabad A, Azami K, Soodi M, Kazemi A, Kebriaeezadeh A, Sharifzadeh M. **Effects of Selective iNOS Inhibitor on Spatial Memory in Recovered and Non-Recovered Ketamine Induced Anesthesia.** *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* (2011), 10 (4): 861-868
- Tavares J, Formaglio P, Thiberge S, Mordelet E, Van Rooijen N, Medvinsky A, Ménard R, Amino R. **Role of host cell traversal by the malaria sporozoite during liver infection.** *J Exp Med.* 2013 May 6; 210(5):905-15
- Tronel C, Rochefort GY, Arlicot N, Bodard S, Chalon S, Antier D. **Oxidative Stress Is Related to the Deleterious Effects of Heme Oxygenase-1 in an *In Vivo* Neuroinflammatory Rat Model.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* Volume 2013, Article ID 26493
- Turner JA, Ruscoe CN, Perrior TR. **Discovery to Development: Insecticides for Malaria Vector Control.** *Chimia (Aarau).* 2016 Oct; 70(10):684-693
- Vallejo D, Codocedo JF, Inestrosa NC. **Posttranslational Modification Regulate Postsynaptic Localization Of PSD-95.** *Mol Neurobiol.* 2017 Apr;54(3):1759-1776.
- Vanka R, Nakka VP, Kumar SP, Baruah UK, Babu PP. **Molecular Targets in Cerebral Malaria for Developing Novel Therapeutic Strategies.** *Brain Res Bull.* 2020 Apr;157:100-107.
- Varo R, Chaccour C, Bassat Q. **Update on malaria.** *Med Clin (Barc).* 2020 Nov 13;155(9):395-402.
- Varo R, Crowley VM, Siteo A, Madrid L, Serghides L, Kain KC, Bassat Q. **Adjunctive therapy for severe malaria: a review and critical appraisal.** *Malar J.* 2018 Jan 24;17(1):47.
- Vinchi F e Tolosano E. **Therapeutic approaches to limit hemolysis-driven endothelial dysfunction: scavenging free heme to preserve vasculature homeostasis.** *Oxid. Med. Cell Longev.* 2013; 2013: 396527
- Vizi ES, Kisfali M, Lőrincz T. **Role Of Nonsynaptic Glun2b-Containing NMDA Receptors In Excitotoxicity: Evidencethat Fluoxetine Selectively Inhibits**

- These Receptors And May Have Neuroprotective Effects.** *Brain Res Bull.* 2013 Apr; 93:32-8.
- Vorhees CV and Williams MT. **Assessing Spatial Learning and Memory in Rodents.** *ILAR J.* 2014; 55(2): 310–332.
- Vyklicky V1, Korinek M, Smejkalova T, Balik A, Krausova B, Kaniakova M, Lichnerova K, Cerny J, Krusek J, Dittert I, Horak M, Vyklicky L. **Structure, Function, And Pharmacolog Of NMDA Receptor Channels.** *Physiol Res.* 2014;63 Suppl 1:S191-203.
- Wah ST, Hananantachai H, Kerdpin U, Plabplueng C, Prachayasittikul V, Nuchnoi P. **Molecular basis of human cerebral malaria development.** *Trop Med Health.* 2016 Sep 27; 44:33
- Wang Y, Qin ZH. **Molecular and cellular mechanisms of excitotoxic neuronal death.** *Apoptosis.* 2010 Nov;15(11):1382-402
- Wang H, Peng RY. **Basic roles of key molecules connected with NMDAR signaling pathway on regulating learning and memory and synaptic plasticity.** *Mil Med Res.* 2016 Aug 31; 3(1):26.
- Wang Y, Liu H, Zhang BS, Soares JC, Zhang XY. **Low BDNF is associated with cognitive impairments in patients with Parkinson's disease.** *Parkinsonism Relat Disord.* 2016 Aug; 29:66-71.
- Wassmer SC and Grau GE. **Severe malaria: what's new on the pathogenesis front?** *Int J Parasitol.* 2016 Sep 23. pii: S0020-7519 (16)30210-7.
- Wiese L, Kurtzhals JA, Penkowa M. **Neuronal Apoptosis, Metallothionein expression and proinflammatory responses during cerebral malaria in mice.** *Exp. Neurol.* 200:216-26, 2006
- White MT, Verity R, Griffin JT, Asante KP, Owusu-Agyei S, Greenwood B, Drakeley C, Gesase S, Lusingu J, Ansong D, Adjei S, Agbenyega T, Ogutu B, Otieno L, Otieno W, Agnandji ST, Lell B, Kremsner P, Hoffman I, Martinson F, Kamthunzu P, Tinto H, Valea I, Sorgho H, Oneko M, Otieno K, Hamel MJ, Salim N, Mtoro A, Abdulla S, Aide P, Sacarlal J, Aponte JJ, Njuguna P, Marsh K, Bejon P, Riley EM, and Ghani AC. **Immunogenicity of the RTS,S/AS01 malaria vaccine and implications for duration of vaccine efficacy: secondary analysis of data from a phase 3 randomised controlled trial.** *Lancet Infect Dis.* 2015 Dec; 15(12): 1450–1458.

- White NJ, Turner GD, Medana IM, Dondorp AM, Day NP. **The murine cerebral malaria phenomenon.** *Trends Parasitol.* 2010 Jan; 26(1):11-5.
- Wu WW, Bryant DN, Dorsa DM, Adelman JP, Maylie J. **Ovarian Hormone Loss Impairs Excitatory Synaptic Transmission at Hippocampal CA3–CA1 Synapses.** *The Journal of Neuroscience*, October 9, 2013 • 33(41):16158 – 16169
- Wu HM, Tzeng NS, Qian Li, Wei SJ, Hu X, Rawls SM, Flood P, Hong JS, Lu R. **Novel Neuroprotective Mechanisms of Memantine: Increase in Neurotrophic Factor Release from Astroglia and Anti-Inflammation by Preventing Microglial Over-Activation.** *Neuropsychopharmacology.* 2009 Sep; 34(10): 2344–2357.
- Xia P, Chen HS, Zhang D, Lipton SA. **Memantine Preferentially Blocks Extrasynaptic Over Synaptic NMDA Receptor Currents In Hippocampal Autapses.** *J Neurosci.* 2010 Aug 18;30(33):11246-50
- Xiao L, Patterson PS, Yang C, Lal AA. **Role of Eicosanoids in The Pathogenesis of Murine Cerebral Malaria.** *Am J Trop Med Hyg.* 1999 Apr;60(4):668-73.
- Yang QQ, Zhou JW. **Neuroinflammation in the Central Nervous System: Symphony of Glial Cells.** *Glia.* 2019 Jun;67(6):1017-1035.
- Yu G, Wu F, Wang ES. **BQ-869, a novel NMDA receptor antagonist, protects against excitotoxicity and attenuates cerebral ischemic injury in stroke.** *Int J Clin Exp Pathol.* 2015; 8(2): 1213–1225.
- Zaw MT, Lin Z. **Human Plasmodium knowlesi infections in South-East Asian countries.** *J Microbiol Immunol Infect.* 2019 Oct;52(5):679-684.
- Zhang ZW, Cheng J, Xu F, Yuan M, Du JB, Shang J, Wang Y, Du L, Li ZL, Yuan S. **Mammal Cells Double Their Total RNAs against Diabetes, Ischemia Reperfusion and Malaria-Induced Oxidative Stress.** *M O L. M E D.* 1 7 (5 - 6) 5 3 3 - 5 4 1, MAY- J U N E 2 0 1 1
- Zhuo M, Laitinen JT, Li XC, Hawkins RD. **On the respective roles of nitric oxide and carbon monoxide in long - term potentiation in the hippocampus.** *Learn Mem.* 1998 Nov-Dec; 5(6):467-80

Zhu J, Krishnegowda G , Gowda DC . **Induction Of Proinflammatory Responses In Macrophages By The Glycosylphosphatidylinositols Of Plasmodium Falciparum: The Requirement Of Extracellular Signal-Regulated Kinase, P38, C-Jun N-Terminal Kinase And NF-Kappab Pathways For The Expression Of Proinflammatory Cytokines Andnitric Oxide.** J Biol Chem. 2005 Mar 4;280(9):8617-27.

Zuzarte-Luis V, Mota MM, Vigário AM. **Malaria infections: What and how can mice teach us?** *J Immunol Methods.* 2014 Aug;410:113-22