



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Thaíze Lopes de Souza

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E
MOLECULARES EM CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS APÓS
RECUPERAÇÃO DE MALÁRIA CEREBRAL**

Santa Maria, RS 2017

Thaíze Lopes de Souza

**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E
MOLECULARES EM CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS APÓS
RECUPERAÇÃO DE MALÁRIA CEREBRAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de PósGraduação em Farmacologia, Área de Concentração em Neuropsicofarmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre de Farmacologia**.

Orientador: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira


Santa Maria, RS 2017

Thaíze Lopes de Souza

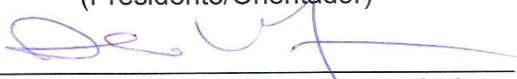
**ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E
MOLECULARES EM CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS APÓS
RECUPERAÇÃO DE MALÁRIA CEREBRAL**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-
Graduação em Farmacologia, Área de
Concentração em Neuropsicofarmacologia,
da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM,RS), como requisito parcial para
obtenção do título de **Mestre de
Farmacologia**.


Aprovado em 07 de julho de 2017:



Mauro Schneider Oliveira, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Denis Broock Rosemberg, Dr. (UFSM)



Alencar Kolinski Machado, Dr. (UNIFRA)

Santa Maria, RS
2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família.

Dedico aos meus pais.

Dedico ao meu irmão.

Dedico ao meu primo.

Dedico ao meu namorado.

Dedico as minhas gordinhas.

Dedico aos meus amigos.

Dedico aos meus espíritos de luz.

AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo não somente à Deus, mas também aos espíritos de luz que sei que me acompanharam ao longo de toda a minha trajetória, guiando meus passos e garantindo que tudo aquilo que um dia almejei pudesse se tornar realidade. Prova disso que as coisas não ocorreram exatamente da forma que esperava, mas da melhor forma para que eu tirasse deste caminho uma lição e um aprendizado. Em especial agradeço ao meu pai, Roberto Ricardo da Fonseca de Souza (*in memmorian*) e ao meu primo, Rodrigo da Silva Fiorin (*in memmorian*). Agradeço imensamente àqueles que estiveram comigo ao longo de todos os dias e que me ajudaram, de alguma forma, a chegar até aqui!

Agradeço ao meu pai Luís (sim, tenho dois pais, porque a vida, às vezes, tem essa mania de nos presentear com pessoas incríveis!) e à minha mãe Claudia, que fizeram do impossível um mero detalhe e, assim, tornaram possíveis os meios e caminhos para que eu me tornasse quem sou, jamais medindo esforços para que eu e o mano pudéssemos ter sempre o melhor! Agradeço muito ao meu irmão mais lindo do mundo, Thiago, por todo amor, companhia, cumplicidade, abraços, carinhos e conversas que tivemos em todos os momentos e, principalmente, nesta etapa um pouco mais precisada de compreensão.

Seguindo nesta linha de pensamentos bons, agradeço igualmente ao meu primo amado, Lucas, também pela companhia, amor e cumplicidade ao longo desta etapa! Como costumo pedir em oração: “que toda a cumplicidade conquistada ao longo dos últimos anos morando juntos, eu, você e o mano, e dividindo não somente o apartamento mas também as angústias e felicidades de tudo o que cada um de nós viveu, persista através do tempo e da distância!”. Que nós três possamos permanecer unidos, como os irmãos são! Sou eternamente grata por ter vocês dois em minha vida! Ainda aproveitando a linha, agradeço todo apoio das minhas cunhadas amadas, Leticia e Dariane! Vocês são incríveis!

Agradeço aos meus avós Divanir e Erotildes que desde sempre estão ao meu lado! Desde os momentos mais difíceis e nem tão bonitos assim até os mais lindos

dias da minha vida! Meu mais sincero 'muito obrigada' por todo o amor, tempo e cuidados que dedicaram a mim! Sem vocês, com toda a certeza, nada disso seria possível!

Deixo aqui também um agradecimento muito especial à minha prima, irmã, mãe emprestada e tudo mais que remete ao amor e carinho, Alessandra! Obrigada por tudo que tu, o Leonardo e meus gurizinhos sempre fizeram por mim!

Agradeço também aos meus tios e primos que sei que sempre acompanharam e torceram para que meus sonhos e objetivos fossem realizados!

Também tenho que agradecer aqui, com o coração transbordando de amor, as minhas gordinhas, por toda a emoção e felicidade com que me recebiam em cada retorno para casa! Raiska, Maggie (*in memorian*), Kira (*in memorian*), Sol, Zuca e Vicky! Amo vocês minhas gordinhas lindas!

Agradeço ao meu namorado, Leandro, por todo o apoio nesta etapa emocionalmente conturbada mas cheia de evolução e aprendizado. Agradeço por todo o amor, carinho e apoio! Agradeço todos os dias por ter você na minha vida!

Agradeço aos meus amigos que de forma incansável estiveram comigo, fosse no laboratório ou no final do dia para comer e encerrar o dia da forma mais feliz e fazendo o que fazemos de melhor nessa vida! Pedro, Mari, Weli, Nati, Marina, Sarinha, Erik, Teixeira, Alexandre, Busa, Flávia, Iuri e Marília! Sem palavras pra vocês!

Agradeço ainda aos meus presentes amados dessa vida de laboratório, Vini e Fe! Individualmente: Vini, muito obrigada por toda a amizade, parceria e ensinamentos! Tenho um carinho gigante por ti e sempre estou contigo nos meus pensamentos mais alegres! Fe, Fezinha, Ferdinanda, você caiu como um presente para as Alemoas desse laboratório! Sabe um tripé? Então, somos nós! Obrigada por tudo Fe amada, pela paciência com as nossas loucuras, pela amizade, pelas conversas e experimentos compartilhados, de ensino mútuo! Tu sabe o quanto agradecemos a tua amizade!

Bom, peço licença aos demais amigos, mas preciso deixar aqui um agradecimento muito especial àquela que foi minha dupla, minha irmã, minha amiga de vida, de laboratório, de noites não dormidas para estudar, trabalhar ou comer!

Ana amada! As alemoas, a B1 e a B2, “Zales”... Estou pensando aqui tudo o que fomos ao longo desses quase 5 anos de laboratório... fomos (e somos) uma grande dupla no trabalho, na vida e na cumplicidade e amizade incansável de todas as horas! Poderia ficar aqui escrevendo muitas páginas sobre o que vivemos juntas, mas jamais conseguiria expressar tudo o que tu significa pra mim! Obrigada por tudo amiga! Te amo muito e tu sabe disso!

Agradeço aos amigos e colegas dos laboratórios Farmatox e Lafarmit, que estiveram nesta caminhada, compartilhando não somente a amizade e o companheirismo mas, também, as angústias e os trabalhos. Agradeço imensamente a vocês por tornarem esta jornada mais leve. Ainda deixo aqui um agradecimento especial à Ana Braga, que nesta reta final nos ajudou tanto, sendo nosso maior apoio quando não estávamos presentes para resolver algumas questões.

Além disso, também quero agradecer imensamente à Zeli, secretária do departamento do Programa de Pós Graduação em Farmacologia, que, sem medir esforços, nos ajudou, nos ouviu e nos acalmou. Muito obrigada pelo apoio não somente no período final do mestrado, como também durante os dois anos em que estivemos indo a sua sala diariamente, e cada dia com um motivo diferente! Muito obrigada pela paciência e por ser essa profissional incrível!

Agradeço também ao meu professor orientador Mauro por ter nos ensinado que embora a vida nesse mundo da pesquisa não seja sempre fácil, é possível seguir em frente com um objetivo; embora não venham tantos recursos quanto gostaríamos, tem sempre uma adaptação que podemos fazer; e ainda que apenas escrever bem com a caneta azul não seja suficiente para adquirir conhecimentos, é possível trabalhar para ser reconhecido por isso, por mérito! Agradeço imensamente a oportunidade de ter crescido e aprendido contigo, professor!

Por último, mas não menos importante, agradeço aos camundongos que tornaram possível este trabalho que hoje defendo!

Os agradecimentos são muitos, mas é assim, chegou a hora de agradecer algumas coisas e a algumas pessoas, depois de tantos anos fazendo pedidos de que tudo desse certo e para que esse dia chegasse!

Meu mais sincero muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram com a minha trajetória e meu aprendizado! Cada um sabe o quanto foi importante pra mim!

Obrigada!

Gratidão é minha palavra!

EPÍGRAFE

*“Não é sobre ter todas as pessoas do mundo pra si
É sobre saber que em algum lugar, alguém zela por ti
É sobre cantar e poder escutar mais do que a própria voz
É sobre dançar na chuva de vida que cai sobre nós*

*É saber se sentir infinito
Num universo tão vasto e bonito, é saber sonhar
Então fazer valer a pena
Cada verso daquele poema sobre acreditar*

*Não é sobre chegar no topo do mundo e saber que venceu
É sobre escalar e sentir que o caminho te fortaleceu
É sobre ser abrigo e também ter morada em outros corações
E assim ter amigos contigo em todas as situações”*

Ana Vilela

RESUMO

ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS, BIOQUÍMICAS E MOLECULARES EM CAMUNDONGOS C57BL/6 MACHOS APÓS RECUPERAÇÃO DE MALÁRIA CEREBRAL

AUTORA: Thaíze Lopes de Souza
ORIENTADOR: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

A malária é uma doença parasitária que pode ser causada por diferentes espécies do protozoário do gênero *Plasmodium* e é transmitida ao hospedeiro através da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*. A forma mais grave da doença é causada pelo *Plasmodium falciparum*, a qual apresenta alta taxa de mortalidade e pode levar ao desenvolvimento tardio de déficits cognitivos, o qual ainda não está completamente elucidado. O presente estudo, através de um modelo experimental de malária cerebral obtido pela inoculação do *Plasmodium berghei* ANKA em camundongos C57BL/6 machos, teve por objetivo determinar a influência desta condição severa sobre o comportamento, parâmetros bioquímicos e neurotransmissão gabaérgica destes animais. Tivemos por hipótese que a malária cerebral seja capaz de induzir alterações no sistema nervoso central, as quais podem ter o mecanismo de ação elucidado através da indução do modelo experimental, permitindo, assim, esclarecer os dados relatados na literatura clínica. Quando comparados aos animais controles, observamos que os camundongos infectados apresentaram maior expressão da fosforilação da Na^+, K^+ -ATPase no resíduo Ser⁹⁴³, determinada através de Western Blot, bem como diminuição da atividade das isoformas da enzima que possuem as subunidades $\alpha 2/\alpha 3$ em amostras de córtex cerebral. Além disso, neste mesmo tecido, por meio de ensaio de união específica com [3H]-Flunitrazepam, foi observada uma diminuição na capacidade de ligação dos receptores GABA_A nos animais recuperados da malária cerebral, enquanto que, em amostras obtidas a partir do hipocampo destes animais, foi possível detectar, através da técnica de Dot Blot, um aumento na expressão da proteína carbonilada. Embora não tenhamos encontrado alterações histológicas macroscópicas, os testes comportamentais demonstraram que o comportamento natural esperado para os camundongos C57BL/6 foi alterado após a infecção e recuperação, tendo sido visto uma diminuição na taxa de construção do ninho e aumento no número de bolas de vidro enterradas durante a realização do teste quando comparados aos animais controles. Sendo assim, os dados apresentados neste estudo demonstram que alterações comportamentais e neuroquímicas persistem mesmo após a erradicação do parasita e remissão da MC, estando de acordo com demonstrações clínicas e, também, podendo estar relacionados ao aumento da susceptibilidade a crises convulsivas demonstradas em estudos anteriores. Embora mais estudos sejam necessários, os marcadores bioquímicos apresentados podem tornar-se um alvo para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para a MC.

Palavras-chave: *Plasmodium berghei* ANKA; modelo experimental; cloroquina; comportamento;

ABSTRACT

CEREBRAL MALARIA CAUSES ENDURING BEHAVIORAL AND MOLECULAR CHANGES IN MICE BRAIN WITHOUT CAUSING GROSS HISTOPATHOLOGICAL DAMAGE

AUTHOR: Thaíze Lopes de Souza
SUPERVISOR: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Malaria, a parasitic disease, can be caused by different species of *Plasmodium* protozoan and it is transmitted by the bite of female *Anopheles* mosquitoes. *Plasmodium falciparum* is responsible for the most severe complication of malaria infection, cerebral malaria (CM), as well as, even after successful antimalarial therapy, is related to high mortality and enduring cognitive impairment, which are not completely elucidated. The present study, through an experimental model of cerebral malaria obtained through the inoculation of *Plasmodium berghei* ANKA in C57BL/6 male mice, aimed to determine the influence of this severe condition on behavior, biochemical parameters and gabaergic neurotransmission of these animals. We hypothesized that cerebral malaria is capable to induce changes in the central nervous system, which may have the mechanism of action elucidated through the induction of the experimental model, thus making it possible to clarify the data already reported in the clinical literature. When compared to control animals, we observed that the infected mice showed increased phosphorylation of Na⁺,K⁺-ATPase at Ser⁹⁴³, determined by Western Blot technique, as well as decreased activity of the enzyme isoforms containing $\alpha 2/\alpha 3$ subunits in cerebral cortex samples. In addition, in this same tissue, through [3H]-Flunitrazepam assay, a reduction in binding capacity of GABA_A receptors was observed in animals recovered from cerebral malaria, whereas in samples obtained from the hippocampus, by Dot Blot technique, it was possible to find an increase in the expression of carbonylated proteins. Although we did not find macroscopic histological changes, behavioral tests showed that the expected natural behavior for C57BL/6 mice was altered after infection and recovery, since it was observed a decrease in the nest building rate and an increase in the number of marbles buried when compared to the control group. Therefore, the data presented in this study demonstrate that behavioral and neurochemical changes persist even after parasite eradication and remission of CM, being in agreement with clinical findings and also may be related to the increased susceptibility to seizures demonstrated in previous studies. Although more studies are needed, biochemical markers presented in this study may become a target for the development of new therapeutic strategies for CM.

Keywords: *Plasmodium berghei* ANKA; experimental model; chloroquine; behavior;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. OBJETIVO	11
1.1.1. Objetivo Geral	11
1.1.2. Objetivos Específicos.....	11
1.2. JUSTIFICATIVA.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. MALÁRIA	13
2.2. TERAPIA FARMACOLÓGICA DA MALÁRIA	16
2.2.1. Cloroquina.....	17
2.3. ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS.....	18
2.3.1. Receptor GABA _A	20
2.3.2. Na ⁺ ,K ⁺ -ATPase.....	21
2.3.3. Estresse oxidativo	22
3. MANUSCRITO.....	23
4. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS	52
ANEXO A	60
ANEXO B	61
ANEXO C	62

1. INTRODUÇÃO

A malária é considerada um problema grave de saúde pública e, também, uma doença negligenciada. Esta doença parasitária é transmitida ao homem através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, sendo o causador desta condição o protozoário do gênero *Plasmodium*, o qual pode ser classificado em diferentes espécies, sendo elas o *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium ovale* (MS, 2005).

No ano de 2015, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (WHO), 214 milhões de casos da doença foram reportados, tendo sido registrados, dentre estes casos, 438 mil óbitos. A prevalência destes números no mundo ocorre principalmente nos países economicamente desfavorecidos e localizados na zona tropical (MSF, 2015).

Mais de 90 países encontram-se na zona de risco e, estima-se que aproximadamente um terço da população mundial esteja sob risco de contaminação pelo protozoário *Plasmodium* (HUNT et al., 2006). Dentre estes países, a maior parte dos casos registrados ocorre na África Subsaariana, sendo as crianças com idade inferior a 5 anos a população mais afetada. De acordo com o relato da OMS (2015), nos últimos cinco anos houve uma diminuição de 18% na incidência de casos da doença, entretanto, esta infecção se mantém como a quarta principal causa de óbitos dentre as crianças nesta região africana.

No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (2015), desde o ano 2000 o índice de casos da doença foi reduzido em mais de 50%, enquadrando o país na lista dos países em situação de reversão da incidência da malária. Embora este seja um dado promissor, no ano de 2013 foram registrados 177.767 casos de malária e 41 mortes, grande parte ocorrendo na região Amazônica, onde estão concentrados 99% dos casos relatados aos órgãos de saúde (ONUBR, 2014). No país, as espécies responsáveis pelo desenvolvimento do quadro de malária são o *Plasmodium falciparum*, o *Plasmodium vivax* e o *Plasmodium malariae*, sendo a primeira espécie capaz de levar a um quadro clínico mais grave uma vez que a multiplicação dos parasitas ocorre de maneira mais eficaz (FIOCRUZ, 2013).

As manifestações clínicas da malária podem ser detectadas 10 a 15 dias após a infecção pelo parasita, entretanto, este período latente do protozoário pode variar

de acordo com a espécie infectante. A fase sintomática da doença é caracterizada por sintomas inespecíficos, comuns de muitas outras infecções, sendo representada por cansaço, cefaleia e mal-estar, dificultando, desta forma, o diagnóstico. Esta fase inicial precede o característico quadro de febre da malária, denominado acesso malárico ou ataque paroxístico agudo. Estes sintomas podem ser observados nas quatro espécies já mencionadas (NEVES et al., 2005).

O *Plasmodium falciparum* é responsável por desenvolver a forma mais grave da doença, o que se deve a sua virulência e resistência à ação das drogas utilizadas na clínica para o tratamento da doença (SNOW; TRAPE; MARSH, 2001). Além disso, esta espécie do parasita tem se tornado predominante em muitas das regiões endêmicas, inclusive em países que estão fora do continente Africano (WINSTANLEY, 2000).

A malária cerebral (MC), uma complicação neurológica que frequentemente está associada a altos índices de mortalidade e comorbidades, mesmo após remissão da doença, é a apresentação clínica mais severa da malária (OPOKA et al., 2009). Muitos danos neurológicos apresentados por pacientes que tenham sobrevivido ao quadro clínico de MC persistem por não mais que seis meses após o diagnóstico, entretanto, há outros que levam a déficits permanentes ou podem aparecer posteriormente ao tratamento e cura da doença, como a epilepsia (MUNG'ALA-ODERA; SNOW; NEWTON, 2004).

Diversas alterações podem ser consideradas características de MC em pacientes afetados por tal condição, tais como alterações nos níveis de consciência, podendo progredir para o estado de coma, episódios de crises convulsivas e alterações cognitivas e comportamentais. Em áreas consideradas endêmicas, aproximadamente metade das crianças admitidas em hospitais com sintomas clínicos da doença apresentam um ou mais destes sinais neurológicos (MISHRA; NEWTON, 2009).

Estudos com pacientes e também no período *post mortem* têm correlacionado estas manifestações clínicas com achados laboratoriais histopatológicos, contribuindo, desta forma, para uma melhor compreensão da MC. Entretanto estes estudos apresentam limitações em relação à determinação dos mecanismos através dos quais a doença age, tornando os estudos experimentais de grande relevância

para o entendimento dos fatores envolvidos na patogênese desta condição (LACERDA-QUEIROZ et al., 2010).

1.1. OBJETIVO

1.1.1. Objetivo Geral

Avaliar se a indução de um modelo experimental de MC é capaz de causar e sustentar déficits comportamentais e alterações bioquímicas e moleculares após o tratamento e cura da doença.

1.1.2. Objetivos Específicos

Em um modelo experimental de MC o trabalho em questão teve por objetivos:

- Avaliar possíveis déficits comportamentais destes animais durante o desenvolvimento da doença;
- Determinar possíveis alterações na aprendizagem e formação da memória dos animais 46 dias após a infecção;
- Avaliar possíveis alterações locomotoras 46 dias após a infecção;
- Avaliar possíveis alterações comportamentais 46 dias após a infecção;
- Determinar a imunorreatividade da Na^+, K^+ -ATPase e sua fosforilação em córtex cerebral;
- Mensurar marcadores de estresse oxidativo no córtex cerebral e hipocampo;
- Estimar a densidade dos receptores GABA_A em córtex cerebral;
- Determinar possíveis alterações histopatológicas no hipocampo.

1.2. JUSTIFICATIVA

A malária, doença parasitária transmitida aos seres humanos através da fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, atinge principalmente crianças que se

encontram nas zonas endêmicas, zona tropical do globo. A maior parte dos casos relatados da doença é observada no continente africano e nas Américas, ocorrendo principalmente em países em desenvolvimento.

A transmissão da doença é bastante facilitada quando há um ambiente favorável ao desenvolvimento do vetor, onde, geralmente, há deficiência do sistema de saneamento básico e precariedade nas condições em que a população atingida vive. Além disso, não havendo um diagnóstico rápido, ou mesmo, a impossibilidade de tratamento ou tratamento inadequado pode favorecer o desenvolvimento da forma mais grave da doença, a MC.

A MC, em humanos causada pelo *Plasmodium falciparum*, pode levar a sequelas que podem ser notadas mesmo seis meses após a cura desta condição, ou, ainda, podem aparecer tardiamente, tais como a epilepsia. Dessa forma, é de grande importância o estudo desta doença através de modelos experimentais, e também das suas consequências à longo prazo, a fim de elucidar os possíveis mecanismos envolvidos no desenvolvimento da doença e sequelas, bem como desenvolver novos tratamentos. Além disso, através destes estudos experimentais se torna possível a análise de novos biomarcadores que possam estar envolvidos com o desenvolvimento da MC.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. MALÁRIA

Malária, ou também denominada paludismo, é uma doença parasitária de evolução rápida e que pode se apresentar de forma bastante grave, de acordo com a espécie do protozoário infectante, da faixa etária do paciente e do sistema imune do mesmo (NEVES et al., 2005). De acordo com a OMS (2015) apesar de todos os esforços envolvidos na erradicação da doença, números elevados referentes aos casos e mortes relatadas aos órgãos de saúde persistem. No ano de 2015, também de acordo com a organização, 88% dos casos registrados ocorreram na África, sendo a República Democrática do Congo e a Nigéria os Estados que apresentam condição mais preocupante, correspondendo à aproximadamente metade das mortes em decorrência da malária, sendo a distribuição global dos casos de transmissão da doença observada principalmente na faixa tropical do globo, como apresentado na figura 1.

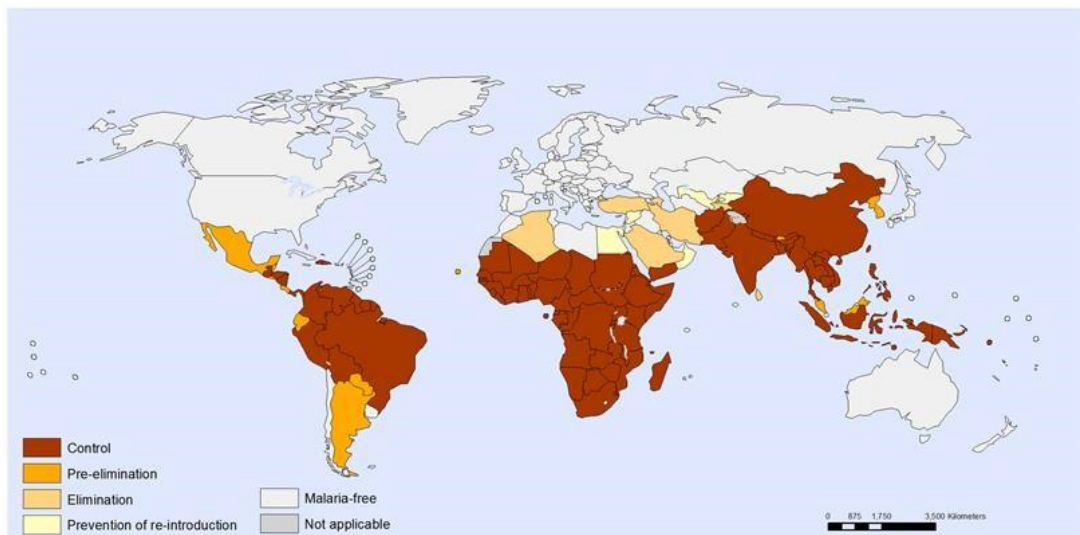


Figura 1. Distribuição global dos casos de malária, sendo indicados os países onde há maior ou menor controle dos casos de infecção pelo protozoário do gênero *Plasmodium*. Dados da OMS, 2014.

Existem quatro espécies de protozoário capazes de infectar humanos: *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium falciparum*, os quais apresentam diferenças entre si em relação aos locais onde são

transmitidos, à velocidade de multiplicação da cepa e à capacidade infectante, o que, por sua vez, pode ser um fator determinante para a gravidade e consequências da doença. O vetor do protozoário responsável pelo desenvolvimento da malária é a fêmea do mosquito do gênero *Anopheles*, o qual também possui diferentes espécies capazes de transmitir a doença aos seres humanos, como, por exemplo, o *Anopheles darlingi*, com maior incidência na Amazônia Legal, e o *Anopheles aquasalis*, o qual predomina nas regiões litorâneas, devido a sua preferência por águas salobras (SBI, 2016).

Após a transmissão do protozoário ao hospedeiro, através da saliva do mosquito, os parasitas atingem as células do fígado rapidamente, local onde permanecem por um período que pode compreender entre 8 e 30 dias, dependendo da espécie infectante, multiplicando-se de forma intensa e bastante rápida. Após este período, determinado como forma latente da infecção, não havendo sintomas aparentes, os parasitas se deslocam para a circulação sanguínea e iniciam a infecção de eritrócitos, momento de início da fase sintomática da malária, no qual aparecem as manifestações clínicas da doença (FIOCRUZ, 2013) (figura 2). Os sintomas iniciais da malária podem ser facilmente confundidos com aqueles que ocorrem em infecções virais, como a gripe. Entretanto, o atraso do diagnóstico ou mesmo o tratamento inadequado, quando há infecção pelo *Plasmodium falciparum*, podem levar à ocorrência da forma mais grave da doença: a MC (BARON, 1996).

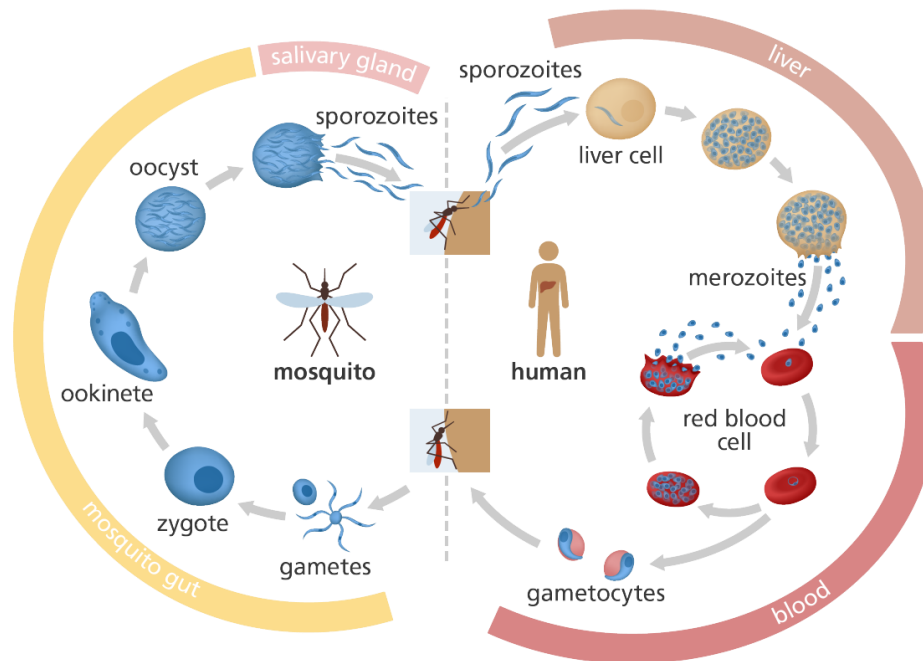


Figura 2. Exemplificação do ciclo de transmissão do protozoário *Plasmodium berghei* ANKA, tanto no mosquito transmissor, o *Anopheles*, quanto no organismo hospedeiro (NEVES et al., 2005).

MC é a apresentação clínica mais severa da infecção pelo *Plasmodium falciparum*, sendo caracterizada, de acordo com a OMS (2015), como uma encefalopatia difusa acompanhada por quadro de coma e crises convulsivas, confirmada através das formas assexuadas do protozoário encontradas no interior dos eritrócitos em lâminas de esfregaço sanguíneo ou pela técnica da gota espessa. Sem tratamento esta condição pode ser considerada potencialmente fatal, principalmente em crianças, entretanto, mesmo com tratamento adequado a taxa de mortalidade entre estes pacientes permanece elevada, com índices próximos a 15% (DONDORP et al., 2005). Além disso, tanto em crianças quanto em pacientes adultos que sobrevivem ao quadro de MC, embora com incidência menor nestes últimos, são relatados déficits neurológicos e sequelas que permanecem após a cura da doença, como a ocorrência de crises convulsivas, coma e aumento da pressão intracranial (IDRO et al., 2010).

O modelo de indução de MC experimental ocorre através da inoculação do *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) em camundongos, sendo fundamental para a elucidação da patogênese e resposta imune da doença, uma vez que estudos *in vivo* ou *post mortem* são dificultados devido à necessidade de técnicas invasivas. Além

disso, modelos experimentais permitem a análise de possíveis mecanismos de ação relacionados ao desenvolvimento da doença e de suas sequelas, nos quais novos tratamentos possam atuar e agir de maneira preventiva, paliativa e/ou curativa (IDRO et al., 2010; LACERDA-QUEIROZ et al., 2010).

2.2. TERAPIA FARMACOLÓGICA DA MALÁRIA

De acordo com a (OMS, 2015), que tem por objetivo, através de acordos políticos e apoios financeiros, garantir que as taxas de transmissão da doença continuem em regressão, um dos maiores desafios a serem enfrentados é o aumento da resistência dos parasitas às medicações hoje disponíveis na clínica, bem como a resistência dos mosquitos à ação dos inseticidas. Através desta estratégia espera-se garantir tanto a quimioprevenção quanto o fornecimento de tratamento adequado e de qualidade a todos os pacientes acometidos com a malária. Pretende-se por esta ação permitir o acesso àqueles medicamentos recomendados pela OMS, os quais são, geralmente, associações medicamentosas à base de artemisinina.

Entretanto, a escolha dos fármacos a serem disponibilizados irá depender da apresentação da doença, sendo classificada como complicada ou não complicada; da região onde ocorreu a contaminação, se determinada endêmica ou não; bem como da espécie do protozoário infectante (OMS, 2015). Os tratamentos disponíveis para remissão e cura da malária visam atingir pontos chave do ciclo evolutivo do parasita, os quais apresentam, em sua maioria, atividade contra as formas eritrocíticas do protozoário (AMOA ONGUENE et al., 2013).

Os antiparasitários utilizados atualmente em pacientes diagnosticados com malária envolvem a administração de quinina, cloroquina, mefloquina, primaquina e artemisinina, por exemplo, podendo ser indicados individualmente ou em associação (AMOA ONGUENE et al., 2013). No entanto, algumas espécies do protozoário desenvolveram resistência aos tratamentos disponíveis, o que tem sido relacionado a alterações genéticas, denominadas polimorfismos genéticos (DRONAMRAJU; ARESE, 2006), tornando-se uma preocupação para a OMS, uma vez que isso pode

afetar o controle da transmissão e estabelecimento da doença em países que se encontram em quadro de remissão ou eliminação total dos casos da doença.

No Brasil, foi disponibilizado pelo (MS, 2010), no qual são apresentadas informações sobre os tratamentos a serem disponibilizados aos pacientes, uma vez que no país as condições às quais os pacientes estão expostos bem como as espécies infectantes prevalentes diferem de outras regiões endêmicas, como a África, por exemplo. Estes tratamentos devem ser definidos de acordo com o histórico de exposição do paciente à infecção, situação do paciente no momento do diagnóstico da doença, devendo ser considerada a idade do paciente, gestação, no caso das mulheres, e problemas de saúde que possam agravar o quadro da doença, bem como devem ser definidos de acordo com a espécie do plasmódio infectante.

2.2.1. Cloroquina

A cloroquina (figura 3), droga de escolha para realização do presente trabalho, é um composto antimalárico eficaz, entretanto, tem seu uso diminuído em regiões onde há cepas do parasita resistentes à sua ação, localizadas principalmente no continente africano. Este fármaco é mais potente e menos tóxico que a quinina e, em doses terapêuticas, é considerado bastante seguro. Além disso, já foi relatado que a cloroquina é capaz de suprimir crises agudas de malária quando causadas pelo *Plasmodium vivax* ou pelo *Plasmodium ovale*. Ao ser administrada em pacientes com diagnóstico de malária, também é capaz de controlar rapidamente os sintomas, e, não havendo diminuição dos mesmos, tem-se indicativo de infecção por cepa resistente ao tratamento (BAGAVAN et al., 2011).

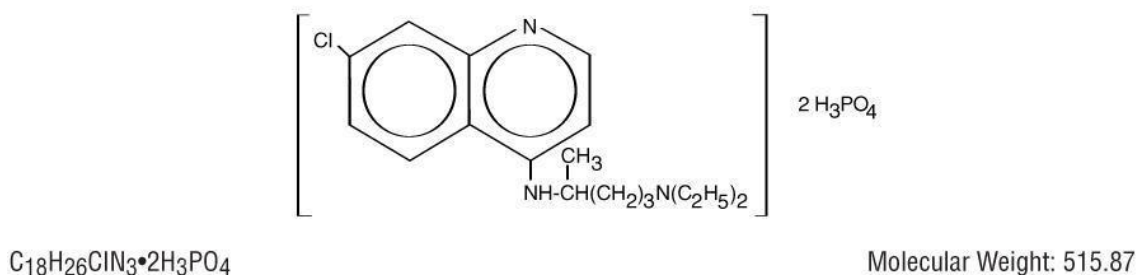


Figura 3. Estrutura molecular da cloroquina. Fonte (DAILYMED), acessada em 19 de abril de 2016.

Cloroquina é um agente esquizonticida sanguíneo ativo apenas contra as formas assexuadas eritrocíticas da maioria das cepas de *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium vivax*, e algumas cepas de *Plasmodium falciparum*. Este fármaco antimalárico concentra-se nos vacúolos digestivos do protozoário, tornando-se protonado, diminuindo o pH e, assim, impedindo que o plasmódio utilize a hemoglobina presente no glóbulo vermelho, a qual, além de ser fonte de aminoácidos essenciais à viabilidade do parasita, quando metabolizada, também é tóxica ao parasita quando inalterada, sendo capaz de induzir o plasmódio à morte (FIOCRUZ, 2006; SCHLITZER, 2007) e (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2006).

Além de atuar como agente antiparasitário, outras ações da Cloroquina, que independem do seu acúmulo nos vacúolos digestivos do plasmódio, já foram relatadas, sendo elas sua eficácia como agente antiviral, antifúngico e antibacteriano. A cloroquina também é utilizada em tratamentos oncológicos, entretanto os mecanismos de ação envolvidos nesta terapia não estão completamente elucidados (LIU; SHANG; CHEN, 2014; ROLAIN; COLSON; RAOULT, 2007).

De acordo com o Guia de Tratamento da Malária (2015), fornecido pela OMS, a cloroquina é rapidamente absorvida no trato gastrointestinal e somente uma pequena percentagem da dose administrada é eliminada através das fezes. Aproximadamente 55% do fármaco é encontrado ligado a proteínas plasmáticas e, portanto, a excreção da cloroquina é bastante lenta, mas pode ser aumentada através da acidificação da urina. Ela possui ampla distribuição nos tecidos e fluidos corporais, e apresenta pico plasmático 1 ou 2 horas após a administração, sendo metabolizada no fígado através das enzimas CYP2C8 e CYP3A4 (FIOCRUZ, 2006).

2.3. ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS

O sistema nervoso central (SNC) apresenta resposta imune limitada devido à barreira hematoencefálica, a qual restringe o acesso de moléculas e possíveis agentes invasores à região cerebral, entretanto, sabe-se que pacientes com quadro de MC apresentam ruptura desta barreira. Este dado tem sido relacionado com achados histopatológicos como o aparecimento de pequenos pontos de hemorragias

em diferentes estruturas cerebrais, denominados petéquias, bem como também pode ser vista ativação endotelial, redistribuição de astrócitos e sequestro de eritrócitos parasitados, pois estes expressam antígenos específicos capazes de interagir com proteínas presentes nas células endoteliais dos vasos sanguíneos (LACERDA-QUEIROZ et al., 2010; NEWTON; HIEN; WHITE, 2000).

Estudos clínicos realizados com pacientes diagnosticados com quadro de MC puderam demonstrar, durante o período agudo da infecção, alguns déficits relacionados a esta condição, tais como síndrome do neurônio motor superior e anormalidades posturais (SATTAR et al., 2009). As principais sequelas relacionadas ao SNC referem-se à ocorrência de crises convulsivas e coma prolongado, além de serem observados quadros de hipoglicemia e anemia severa em pacientes acometidos com a doença. Entretanto, alguns sintomas podem ser passageiros e outros podem permanecer ou mesmo apenas surgir no período crônico da doença, mesmo após a cura da malária com tratamento adequado (BONDI, 1992; BREWSTER; KWIATKOWSKI; WHITE, 1990). Além destes sintomas, Martins e colaboradores (2009) também observaram, em pacientes hospitalizados, bruxismo, alterações de personalidade, depressão e comportamento de ansiedade.

As sequelas observadas após MC podem estar associadas a diversos fatores, não estando os mecanismos envolvidos completamente elucidados. Além disso, se tem conhecimento de que crianças e pacientes adultos apresentam diferenças quanto aos sintomas apresentados, à severidade destes e à resposta ao tratamento, havendo maior taxa de mortalidade entre a população com idade inferior a 5 anos, (LACERDA-QUEIROZ et al., 2010).

A indução do modelo experimental de MC através da inoculação de PbA não é capaz de reproduzir todas as características observadas na doença humana, mas alterações e lesões encontradas nas células de roedores submetidos a este modelo experimental se aproximam dos dados relatados na literatura clínica. Além disso, a semelhança entre os antígenos expressos durante a infecção, bem como as vias da resposta imune envolvidas, permitem a elucidação das alterações características da doença (BAGOT et al., 2002).

2.3.1. Receptor GABA_A

O ácido γ -aminobutírico (GABA), formado a partir do ácido glutâmico pela ação da enzima descarboxilase do ácido glutâmico (DAG), é considerado o principal neurotransmissor inibitório do SNC, atuando através de sua interação com diferentes subclasses do receptor GABA, sendo elas GABA_A, GABA_B e GABA_C (KALUEFF; NUTT, 2007; MCCARSON; ENNA, 2014). Os efeitos farmacológicos, bem como a importância deste neurotransmissor, puderam ser determinados através da administração de agonistas e antagonistas destes receptores em modelos experimentais, demonstrando efeitos sobre o comportamento semelhante à ansiedade, o relaxamento muscular, melhora de parâmetros cognitivos, além de atividade estimulante e anticonvulsivante (BOWERY; ENNA, 2000; ENNA; MCCARSON, 2006).

Os receptores GABA_A encontram-se amplamente distribuídos no tecido cerebral e têm sido estudados como possível alvo farmacológico para o desenvolvimento de novas terapias anticonvulsivantes (KROGSGAARD-LARSEN; EGEBJERG; SCHOUSBOE, 2002). Estes receptores, classificados como ionotrópicos, são proteínas de membrana organizadas em uma estrutura pentamérica permeável aos íons cloreto (Cl⁻) (CAMPAGNA-SLATER; WEAVER, 2007; MCCARSON; ENNA, 2014), sendo responsável pelo influxo deste íon e posterior hiperpolarização da membrana neuronal, resultando em sua ação inibitória sobre a excitabilidade do SNC (HAYASHI, 1958).

Estudos clínicos relacionados ao desenvolvimento do quadro de MC (MISHRA; NEWTON, 2009), bem como estudos experimentais (GRAUNCKE et al., 2016), já demonstraram a ocorrência tardia de crises convulsivas, o que pode ser considerado um indicativo da existência de uma relação entre o desenvolvimento da MC e prejuízos na neurotransmissão GABAérgica, uma vez que achados demonstram que falhas nesse sistema inibitório podem levar ao aparecimento de crises convulsivas e desenvolvimento de epilepsia, bem como déficits cognitivos e comportamentais (CROWLEY et al., 2016).

2.3.2. Na⁺,K⁺-ATPase

A Na⁺,K⁺-ATPase, classificada como uma proteína de membrana presente em todas as células eucarióticas dos mamíferos, é responsável pelo transporte de íons sódio (Na⁺) e potássio (K⁺). Para manter a homeostase do gradiente de concentração destes íons nos meios intra e extracelular a bomba de sódio e potássio depende da energia proveniente da hidrólise de uma molécula de trifosfato de adenosina (ATP), por isso sendo classificada como ATPase (APERIA, 2001;2007). Esta enzima, considerada o principal fator regulador do potencial de membrana (DOBRETSOV; STIMERS, 2005), é um heterodímero composto por duas subunidades: α , catalítica, através da qual ocorre o transporte dos íons e onde se liga o ATP; e β , classificada como uma subunidade regulatória e que auxilia na estabilização da conformação da Na⁺,K⁺-ATPase e na sua incorporação à membrana plasmática (APERIA, 2007; APERIA et al., 2016). A atividade da subunidade β ainda não está completamente elucidada, entretanto, estudos já puderam demonstraram que, na sua ausência, a subunidade α não apresenta atividade ATPásica (JORGENSEN; HAKANSSON; KARLISH, 2003; KAPLAN, 2002).

Estudos demonstraram que a Na⁺,K⁺-ATPase é capaz de impedir danos e até mesmo a morte celular em diferentes órgãos, tais como coração, rins e também no cérebro (D'URSO et al., 2008; LI et al., 2006; SIBAROV et al., 2012). Nos seres humanos, o ligante que apresenta maior especificidade de ligação à Na⁺,K⁺-ATPase é a ouabaína, classificada como um esteroide cardiotônico endógeno, o qual também é bastante utilizado em ensaios enzimáticos para determinação da atividade e capacidade de transporte de íons da enzima em diferentes tecidos (APERIA, 2012).

A fosforilação da Na⁺,K⁺-ATPase em sítios específicos é capaz de alterar o transporte dos íons pela enzima, alterando, portanto, a eficácia da bomba devido a efeitos sobre a membrana plasmática ou mesmo por promover a internalização da enzima (BELUSA et al., 1997; CHIBALIN et al., 1997; LOGVINENKO et al., 1996). Além disso, sabe-se que determinadas mutações da Na⁺,K⁺-ATPase, como por exemplo a fosforilação das subunidades $\alpha 2/\alpha 3$ desta enzima, possui papel

importante no desenvolvimento de algumas doenças, tais como epilepsia e o rápido desenvolvimento do quadro característico de Parkinson (APERIA, 2007; FUNCK et al., 2014).

Sabendo que a Na^+, K^+ -ATPase, de acordo com a sua capacidade de ação, pode levar a um aumento ou diminuição da excitabilidade neuronal (GRISAR; GUILLAUME; DELGADO-ESCUETA, 1992) e que quadros infecciosos tais como a MC, podem promover danos ao SNC com a ocorrência de crises convulsivas, é possível que esta enzima tenha relação com o desenvolvimento da forma grave da doença.

2.3.3. Estresse oxidativo

O modelo de MC em camundongos apresenta, como uma característica do desenvolvimento da doença, a ativação de fagócitos no tecido cerebral, o que tem sido relacionado com danos oxidativos observados no tecido, bem como, com o rompimento da barreira hematoencefálica (BHE), o qual é um dos fatores determinantes para que a infecção se apresente na forma mais grave (AMANTE et al., 2010; NEILL; HUNT, 1992). Estes danos são causados, principalmente, pelas espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais são formadas a partir da molécula de oxigênio (O_2) e podem ser consideradas potencialmente tóxicas às células (SZABO, 2003). Entretanto, em determinadas situações, as EROs produzidas podem ser benéficas, como, por exemplo, em quadros infecciosos, dependendo da quantidade de espécies formadas e do local onde são produzidas (SCHIRMER et al., 1987).

Estudos já demonstraram que o estresse oxidativo pode ser considerado um fator importante na patogênese da malária, uma vez que há exacerbação da resposta imune (PERCARIO et al., 2012; REIS et al., 2010). Durante a infecção pelo protozoário do gênero *Plasmodium* foi observado que um dos principais locais de produção de EROs é no vacúolo digestivo formado pelo parasita no interior das hemácias infectadas, o qual sendo uma região de pH ácido, permite a metabolização e degradação da hemoglobina (BECKER et al., 2004). Além disso, a produção de

EROs durante o desenvolvimento da malária é variável conforme a fase de desenvolvimento do parasita no interior dos eritrócitos (GOLENSER et al., 1991).

Sabendo-se que quadros infecciosos podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio e que o tecido cerebral é bastante vulnerável ao dano oxidativo (SCHIRMER et al., 1987), é possível que este processo esteja envolvido com o desenvolvimento do quadro de MC.

3. MANUSCRITO

Os procedimentos experimentais realizados iniciaram-se após a obtenção da carta de aprovação do Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (ANEXO A).

Os materiais e métodos, assim como os resultados e a discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito, este intitulado “*Cerebral malaria causes enduring behavioral and molecular changes in mice brain without causing gross histopathological damage*”, seguindo as normas do periódico ao qual foi submetido, *Neuroscience* (ANEXOS B e C).

Cerebral malaria causes enduring behavioral and molecular changes in mice brain without causing gross histopathological damage

Thaíze Lopes de Souza¹, Ana Claudia Beck Grauncke¹, Leandro Rodrigo Ribeiro^{1,*}, Fernanda Kulinski Mello¹, Sara Marchesan Oliveira², Fátima Brant³, Fabiana S Machado³, Mauro Schneider Oliveira¹

¹Graduate Program in Pharmacology and Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil.

²Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry and Department of Biochemistry and Molecular Biology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

³Graduate Program in Health Sciences: Infectious Diseases and Tropical Medicine and Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Science, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

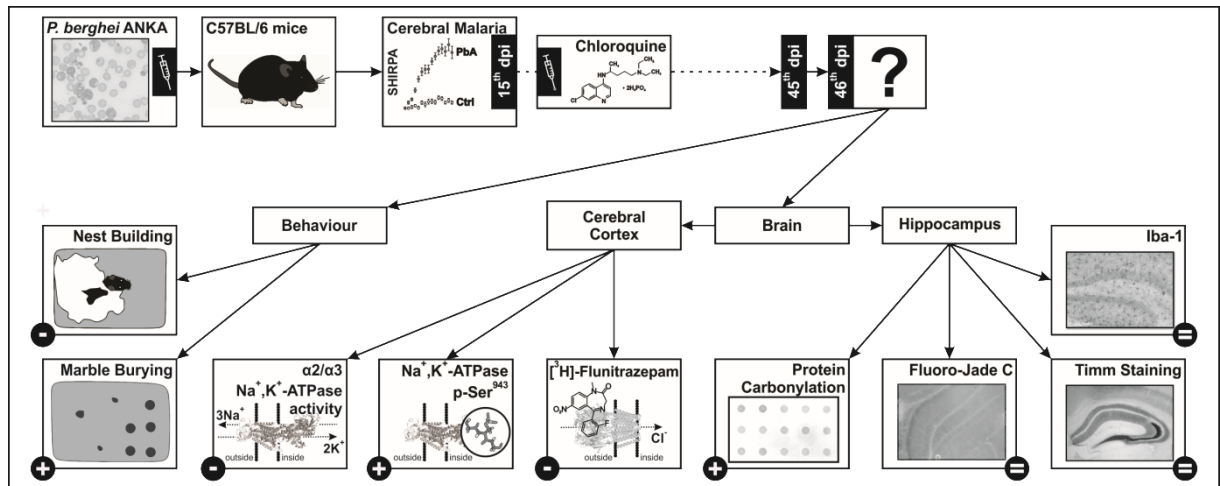
* Corresponding author: Leandro Rodrigo Ribeiro, Department of Physiology and Pharmacology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Santa Maria, Av. Roraima, n° 1000, CEP 97105-900, Brazil.

E-mail: leandrorodrigoribeiro@yahoo.com.br

Keywords: *Plasmodium berghei* ANKA, chloroquine, cognitive deficits, GABA_A receptor, Na⁺,K⁺-ATPase, oxidative stress

Abstract

Malaria, parasitic disease considered a major health public problem, is caused by *Plasmodium* protozoan genus and transmitted by the bite of infected female *Anopheles* mosquito genus. Cerebral malaria (CM) is the most severe presentation of malaria, caused by *P. falciparum* and responsible for high mortality and enduring development of cognitive deficits which may persist even after cure and cessation of therapy. In the present study we evaluated selected behavioral, neurochemical and neuropathologic parameters after rescue from experimental cerebral malaria caused by *P. berghei* ANKA in C57BL/6 mice. Behavioral tests showed impaired nest building activity as well as increased marble burying, indicating that natural behavior of mice remains altered even after cure of infection. Regarding the neurochemical data, we found decreased $\alpha 2/\alpha 3$ Na⁺,K⁺-ATPase activity and increased immunoreactivity of phosphorylated Na⁺,K⁺-ATPase at Ser⁹⁴³ in cerebral cortex after CM. In addition, [³H]-Flunitrazepam binding assays revealed a decrease of benzodiazepine/GABA_A receptor binding sites in infected animals. Moreover, in hippocampus, dot blot analysis revealed increased levels of protein carbonyls, suggesting occurrence of oxidative damage to proteins. Interestingly, no changes in the neuropathological markers Fluoro-Jade C, Timm staining or IBA-1 were detected. Altogether, present data indicate that behavioral and neurochemical alterations persist even after parasitemia clearance and CM recovery, which agrees with available clinical findings. Some of the molecular mechanisms reported in the present study may underlie the behavioral changes and increased seizure susceptibility that persist after recovery from CM and may help in the future development of therapeutic strategies for CM sequelae.



Introduction

Malaria is a serious neglected tropical disease caused by different species of protozoan *Plasmodium*. The World Health Organization (WHO) estimates that 214 million cases and 438,000 malaria-related deaths were reported in 2015, affecting mainly people in the sub-Saharan Africa region (WHO, 2015). Cerebral malaria (CM) is a neurological complication which is associated with high rates of morbidity and mortality, even after infection recovery, and it has been considered the most severe clinical presentation of infection with *P. falciparum* (Hunt et al., 2006, Opoka et al., 2009). In fact, high rates of mortality are observed in patients diagnosed with CM, and about one quarter of survivors presents long-term neurological complications (John et al., 2008, Idro et al., 2010a, Idro et al., 2010b).

Experimental models are useful to investigate mechanisms involved in malaria and possible development of sequelae, since clinical studies present limitations including but not limited to ethical issues and the need of invasive techniques (Lacerda-Queiroz et al., 2010). *P. berghei* ANKA (PbA) strain is considered a wellcharacterized experimental model of CM (ECM) (Hunt et al., 2010). In this context, results obtained with PbA infection model may be relevant to a better comprehension of CM complications that occur in humans. For instance, it has been shown that C57BL/6 mice infected with PbA presents inflammatory and neurological manifestations similar to those observed in humans (Lou et al., 2001, Lamb et al., 2006, Reis et al., 2010), including long-term cognitive deficits (Freeman et al., 2016) and seizure susceptibility (Grauncke et al., 2016). However, molecular mechanisms underlying these findings remain unclear. To the present, most studies have

investigated acute biochemical, histological and behavioral alterations in this experimental model (Reis et al., 2010, Nacer et al., 2012), and therefore more longterm studies are needed. In the present study, we aimed to investigate potential longterm molecular and histological changes which could be involved in the behavioral changes and increased seizure susceptibility that occur after recovery of CM.

Experimental procedures

Animals

Adult male mice C57BL/6, 4-6 weeks old (30-40 g) were used to induce ECM. All animals were maintained under controlled environment (12:12h dark/light cycle, 24±1°C, 55% humidity), free access to food (PuroTrato, Santa Maria, Brazil) and water. All animal experimentation described in this study complied with national and international legislation and with the approval of Institutional Committee on Animal Use and Care of Federal University of Santa Maria (process #020/2014). All protocols aimed to reduce the number of animal used to a minimum, as well as their suffering.

Experimental design

Sixty-Five C57BL/6 male mice were allocated into two independent experimental groups. Since a mortality rate as high as 40% can be encountered in the PbA-induced severe CM model (Reis et al., 2010), 45 animals were inoculated intraperitoneally with 0.1mL suspension of 10⁶ parasitized red blood cells (ANKA strain) and 20 age-matched controls received a similar volume of 10⁶ non parasitized red blood cells. Parasitemia, weight and SHIRPA score (Rogers et al., 2001) were monitored daily. With SHIRPA protocol animals received scores related to piloerection, gait, body position, grip strength, positional reflex and spontaneous activity. Low scores, varying from 0 to 1, indicated normal behavior of animals; 2 to 3,

altered behavior without severe compromise of general activity; 4 to 5, the most severe condition observed and considered positive for CM. When infected animals demonstrated typical neurobehavioral manifestations the treatment with antimalarial Chloroquine (Sigma-Aldrich) was initiated. Approximately on 15th day post infection (dpi), animals of both groups received a loading dose of 80mg/kg of chloroquine and were kept until the 45th dpi in a maintenance dose of 25mg/kg (Reis et al., 2012). The last administration of Chloroquine occurred 24h before behavioral tests or euthanasia.

Behavioral tests

To evaluate persistent behavioral and/or cognitive deficits after rescue of CM, animals were submitted to a behavioral test battery consisting of the following tests: open field (de Oliveira et al., 2016), rotarod (de Oliveira et al., 2016), nest building (Deacon, 2006), marble burying (Deacon, 2012) and sucrose preference (Grigoletto et al., 2016). Behavioral tests were organized from the least to the most aversive and were performed in the same animals during six consecutive days.

Neurochemical assays

In the 46th dpi mice were euthanized to obtain brain samples (cerebral cortex and hippocampus) for neurochemical analyses, such as Western Blot, Dot Blot, Binding and determination of enzymatic activity.

Western blot

Na⁺,K⁺-ATPase α subunit content and its phosphorylation state at Ser⁹⁴³ were carried out according to Funck et al., 2015 with minor modifications. In brief, tissues were gently homogenized in ice-cold Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER, Thermo Fisher Scientific), supplied with Halt protease and phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific). Homogenates were centrifuged at 10,000 x g for 5min at 4°C and an aliquot of the supernatant (20 μ g protein) was submitted to SDS-PAGE using a 10% gel. After semi-dry transfer the nitrocellulose membranes

were blocked with 2.5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) in Tris-buffered saline (TBS, pH 7.4) for 1h and exposed to primary antibodies during 3h at room temperature for α

Na^+, K^+ -ATPase (1:20000, Santa Cruz sc-28800) or overnight at 4°C for p- Na^+, K^+ ATPase α (Ser⁹⁴³) (1:5000, Santa Cruz sc-16170-R). Membranes were washed three times with TBS containing 0.01% (v/v) Tween 20 (TBS-T) and exposed to biotinylated anti-rabbit secondary antibodies (1:10000, Sigma-Aldrich) during 1h at room temperature. Membranes were washed three more times and incubated with streptavidin peroxidase polymer (1:5000, Sigma-Aldrich, S2438) during 1h at room temperature. All antibodies were prepared in TBS-T containing 1.25% BSA. Samples of control and infected mice were processed in parallel on a same gel and were submitted to the same immunoblotting procedures. Ponceau S staining served as the loading control (Romero-Calvo et al., 2010). Immunoreactivity was detected using standard ECL reagent (Thermo Fisher Scientific) and signals were quantified with ImageJ Software.

Na^+, K^+ -ATPase activity

Na^+, K^+ -ATPase activity was measured according to Funck et al., 2015. Changes in individual Na^+, K^+ -ATPase α isoforms caused by CM were investigated using a classical pharmacological approach based on the isoform-specific sensitivity to ouabain. Specific Na^+, K^+ -ATPase activity was calculated by subtracting the ouabain-insensitive activity from the overall activity (in the absence of ouabain). Total Na^+, K^+ -ATPase activity was measured using 4mM ouabain (that inhibits all isoforms) whereas $\alpha 2/\alpha 3$ Na^+, K^+ -ATPase activity was measured in presence of 3 μ M ouabain (that inhibits Na^+, K^+ -ATPase isoforms containing $\alpha 2$ and $\alpha 3$ subunits). The $\alpha 1$ Na^+, K^+ -ATPase activity was then calculated by subtracting the $\alpha 2/\alpha 3$ activity from the total activity.

Dot blot

Oxidative stress markers, protein carbonyl and 4-hydroxy-2-nonenal (HNE), were measured according Funck et al., 2014. Samples were applied to a nitrocellulose membrane through a vacuum system on Dot Blot equipment (BioRad). Membranes were blocked with a 5% (w/v) non-fat dry milk (Nestlé) solution for 1h at room temperature and exposed overnight at 4°C to primary antibodies raised against DNP (1:150, Chemicon 90451) or HNE (1:5000, Santa Cruz 130083). Membranes were washed three times with TBS-T (0.04% (v/v) Tween 20) and exposed to antirabbit (for DNP) or anti-goat (for HNE) secondary antibodies (1:10000) during 1h at room temperature. All antibodies were prepared in TBS-T containing 1.25% non-fat dry milk. Immunoreactivity was detected using 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (SigmaAldrich) and signals were quantified with ImageJ Software.

[³H]-Flunitrazepam binding assay

The [³H]-Flunitrazepam binding assay was assessed in samples from cerebral cortex (200 µg protein/tube) exactly as described in Royes et al., 2016 using 1nM [³H]-Flunitrazepam (85.8Ci/mmol, PerkinElmer) as the probe. The nonspecific binding of each sample was determined by adding 10µM non-radioactive flunitrazepam to the medium in parallel assays. After incubation, the reaction was stopped by vacuum filtration and each filter was washed rapidly three times with 5mL of ice-cold assay buffer. The radioactivity of each sample was determined using a Packard Tri-Carb 2100TR liquid scintillation counter. The specific binding of each sample was considered as the difference between total binding and non-specific binding.

Anatomical processing

At the 46th dpi, animals were anesthetized with ketamine (80 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg) and perfused through the ascending aorta at 10 mL/min with 50 mL 0.9% NaCl containing 0.1% heparin, 50mL with 0.05mol/L sodium sulfide nonahydrate solution, 50mL with sodium chloride with 0,1% heparin, and 200mL with 0.4% paraformaldehyde (PFA, Sigma-Aldrich). The brains were removed and post-fixed in PFA 4% for 4h and then kept in 30% sucrose solution at 4°C. Brains were

sectioned (40 μ m) on a vibration microtome (model KD-400, Zhejiang Jinhua Kedi Instrumental Equipment CO., LTD, Zhejiang Province, China). Coronal sections of the hippocampus were collected (10-14 per mouse) and used in duplicate for subsequent assay of Fluoro-Jade C (FJC) staining, Timm staining (Gu et al., 2012) or ionized calcium binding adaptor molecule 1 (IBA-1) immunoreactivity. Samples from mice submitted to pilocarpine-induced status epilepticus (SE) were processed in parallel and served as quality controls of staining. All images were captured using an Olympus IX81 microscope (Olympus Optical, Hamburg, Germany).

FJC staining

Staining of damaged cells with FJC was carried out according to Gu et al., 2012 with slight modifications. Brains sections were sequentially immersed in basic alcohol solution (0.02% NaOH, 80% ethanol) for 5min, in 70% ethanol for 2min, and distilled water for 2min. Subsequently, sections were transferred to a 0.06% potassium permanganate solution for 20min. Sections were rinsed during 2min in distilled water and were then transferred to 0.0001% FJC staining solution for 90min. After, they were again rinsed in distilled water three times for 2min, dried 30min at room temperature and cleared in xylene for 1min. Finally, sections were mounted using DPX (06522, Sigma-Aldrich) and cover slipped.

Timm Staining

Mossy fiber sprouting was investigated through Timm staining according to (Buckmaster and Lew, 2011) with slight modifications. Sections were incubated in the dark for approximately 60min at 26°C in a solution containing 60mL of 10% polyethylene glycol, 10mL of sodium citrate buffer (pH 4.0), 30mL of 5.67% Hydroquinone, and 500 μ L of 17% silver nitrate solution. After the procedure, the sections were washed with water, dried at room temperature and cover slipped with DPX.

IBA-1 immunoreactivity

Evidence of microglial activation was investigated through immunohistochemical detection of IBA-1 in free-floating sections. These were blocked with 1.5% normal goat serum in 10mM PBS containing 0.5% Triton X for 1h at room temperature and incubated for 72h at 4°C with primary antibodies raised against IBA-1 (1:2000; Wako Chemicals, 019-19741). After washing three times in PBS, sections were exposed to biotinylated goat anti-rabbit secondary antibodies (1:250, Vector Laboratories) for 1h at room temperature. Sections were washed three more times and incubated with avidin-biotin horseradish peroxidase (HRP) complexes for 30min at room temperature (1:125; ABC Vector Elite ABC kit; Vector; PK-4001) followed by three more washing steps. Immunoreactivity was detected using diaminobenzidine (Vector). Sections were transferred to glass slides, air-dried, mounted with Cytoseal™ (8310-16, Thermo Fisher Scientific) and cover slipped.

Statistical analyses

Weight, parasitemia and SHIRPA score were analyzed by repeated measures two-way ANOVA followed by Fisher's LSD test. Behavioral and neurochemical parameters were analyzed by two-tailed unpaired Student's t test. A probability of $p < 0.05$ was considered significant and P values were shown only when significant.

Results

CM assessment

After PbA inoculation mice presented a gradual loss of weight when compared to age-matched controls, peaking at 13-15th dpi [F (44, 1804) = 11.35; $p < 0.0001$] (Fig 1A). Parasitemia reached peak values at 14th dpi, and was completely cleared by the 30th dpi (Fig 1B). SHIRPA scores also progressively increased after PbA infection, and maximum scores were recorded around the 15th dpi [F (44, 1672) = 10.08; $p < 0.0001$] (Fig 1C), corresponding to the peak of CM and meeting the criteria to start chloroquine treatment.

Behavioral tests

We did not find significant differences between PbA-infected versus noninfected controls regarding spontaneous exploratory/locomotor activity or anxiety-like behavior in the open-field. Moreover, fine motor coordination in the rotarod test was not different between groups. In addition, sucrose preference (an index of anhedonia) was not different between infected and control mice (Table 1). On the other hand, when mice's natural behavior was assessed through nesting behavior and marble burying test, we found significant differences in infected versus control animals [t = 2.442; p = 0.0446 and t = 2.688; p = 0.0312, respectively] (Fig 2A and B). [3H]-Flunitrazepam binding

To investigate whether benzodiazepine/GABA_A receptor complexes are altered after rescue from CM, we performed [3H]-Flunitrazepam binding assays in cerebral cortex samples obtained from infected and non-infected animals. Interestingly, the specific [3H]-Flunitrazepam binding was reduced by 39.5% in PbAinfected mice [t = 3.448; p = 0.0183] compared to control mice (Fig 3).

Na⁺,K⁺-ATPase activity, expression and phosphorylation state

In the cerebral cortex samples we found that total (Fig 4A) or α1 (Fig 4B) Na⁺,K⁺-ATPase activities were not altered in animals infected with PbA. However, the activity of α2/α3 isoform of the Na⁺,K⁺-ATPase decreased by 47.65% [t = 3.420; p = 0.0141] (Fig 4C). Moreover, we investigated whether changes in Na⁺,K⁺-ATPase α subunit immunoreactivity or in its phosphorylation at Ser⁹⁴³ may underlie changes in enzyme activity. While we found no changes in total α subunit immunoreactivity (Fig 4D), levels of phosphorylated Na⁺,K⁺-ATPase α subunit at Ser⁹⁴³ increased by 31.67% in PbA-infected animals at the 46th dpi [t = 2.141; p = 0.0480] (Fig 4E). The ratio between total and phosphorylated Na⁺,K⁺-ATPase was not altered (Fig 4F).

Protein carbonyls and protein-HNE adducts

Dot blot analyses were carried out to measure markers of oxidative damage to proteins. Levels of protein carbonyls increased in the hippocampus [$t = 2.294$; $p = 0.0447$] (Fig 5A) but not in the cerebral cortex (Fig 5B) of infected mice. Immunoccontent of protein-HNE adducts in the hippocampus (Fig 5C) or cerebral cortex (Fig 5D) were similar between control and PbA-infected mice.

Brain histopathological analyses

We assessed potential histopathological alterations in the brain of infected mice at the 46th dpi through Fluoro-Jade C staining, a marker of degenerating neurons, (Fig 6B), Timm's sulfide silver staining, to visualize zinc ions in hippocampal mossy fibers, (Fig 6E) and IBA-1 immunohistochemistry, a marker of microglial activation (Fig 6H). In the present study we decided to focus on the hippocampus since deficits of nesting or burying behavior are frequently associated with structural and functional changes in this cerebral area (Ming and Song, 2005). After qualitative evaluation, we did not detected changes in any of these histological parameters when the brain of mice infected with PbA was compared to their age-matched controls (Fig 6A, D and G). To illustrate histopathological alterations, we compared our results to pilocarpine-generated epileptic mice samples, considered positive control (Fig 6C, F and I).

Discussion

Acute studies, performed with this same model of CM induction, have showed cognitive deficits that persist for at least fifteen days after inoculation of PbA (Reis et al., 2010, Reis et al., 2012). In the present study, we evaluated the potential longterm impairment of mice behavior thirty days after CM and we did not find significant changes in this period. Regarding this point, in a mild malaria model, Guha and colleagues (2014) showed selective deficits in social and anxiety-like behaviors at the

peak of parasitemia, with no changes detected in locomotor, cognitive, and depression-like behaviors, and with a return to baseline at recovery.

However, analyzing the first results showed in this study, it is interesting to note that weight loss was not totally recovered and that SHIRPA scores of infected mice remain higher than those of controls even forty-five days after parasite clearing. Altogether, these data indicate that CM causes persistent changes in the overall health of infected mice, as previously demonstrated by Reis and coworkers (Reis et al., 2010, Reis et al., 2012). Besides that, we found nest building score decreased, whereas the number of buried marbles was larger in infected mice. Impairment of nesting and burying behavior is often related with structural and functional changes in hippocampus (Ming and Song, 2005). Accordingly, animals with hippocampal lesions show impairment at spontaneous behavioral tasks, including nest building, digging and marble burying (Deacon et al., 2002, Orta-Salazar et al., 2013, Nichols et al., 2016). We found that infected mice showed significant nesting deficits when compared with controls, using less nesting material and built poorer nests. Moreover, we found an increased marble-burying behavior, which is suggestive of defensive burying typical of neophobia and compulsive-like behavioral (Luhrs et al., 2016).

Molecular changes, as well as GABA-mediated neurotransmission, have been largely studied for a better comprehension of different diseases. However, only a few studies have determined the role of this inhibitory neurotransmitter after induction of CM. For instance Kokwaro and collaborators (1997) have shown that the number of binding sites (B_{max}), but not binding affinity (K_d) of [3H]-Flunitrazepam, decreased in infected rats at the 15th dpi. These results suggest that malaria may be associated with decreased benzodiazepine activity at the peak of CM. The current study extends these findings by showing a long-term (46th dpi) decrease of [3H]-Flunitrazepam binding in mice cortex.

It has long been known that GABAergic system plays a crucial role in development and propagation of seizures, and that changes in GABA_A receptors, with decrease in the number of receptors or their binding capacity, can contribute for that (Gravielle, 2016). There are many possible causes involved in this downregulation, such as reduction in its expression or desensitization, which may occur due to phosphorylation of receptor specific residues or internalization

(Gravielle, 2016). Consequently, impairment of the fast-inhibitory neurotransmission mediated by GABA facilitates the appearance of seizures. Regarding this point, this result seems in agreement with our recent report (Grauncke et al., 2016) in which we demonstrated the increased susceptibility of mice infected with PbA to myoclonic and tonic-clonic seizures induced by pentylenetetrazole (PTZ) after rescue from CM and parasite clearance (46th dpi). Furthermore, a clinical study by (Ikumi et al., 2008) has shown reduced anticonvulsant efficacy of diazepam in children with CM caused by *P. falciparum*. Collectively, these data support the idea that GABAergic transmission is impaired in acute cases as well as after resolution of CM.

Na⁺,K⁺-ATPase, another molecular target that is largely studied, is considered to be a major regulator of brain excitability (Benarroch, 2011). Accordingly, changes in its activity impair the fine-tuning regulation of synaptic transmission and play a critical role in seizure generation (Rose et al., 2009). In the present study there was a selective decrease the Na⁺,K⁺-ATPase isoforms containing α 2 and/or α 3 subunits, which are located in astrocytes and neurons of the cerebral cortex, respectively (Kinoshita et al., 2016). This is particularly interesting since it has been demonstrated that α 3 is the major isoform responsible for rapid extrusion of intracellular Na⁺ in situations of supra threshold neuronal activity, whereas α 2 isoform of the Na⁺,K⁺ATPase is critical to maintenance of astrocytic glutamate uptake (Azarias et al., 2013, Illarionova et al., 2014). In this context, impairment of these activities eventually cause plasma membrane potential depolarization and a large decrease of glutamate uptake (Azarias et al., 2013, Illarionova et al., 2014). Thus, the presently reported changes in α 2/ α 3 Na⁺,K⁺-ATPase activities may help explain, at least in part, the increased brain hyperexcitability and altered behavior which persist after rescue of CM. Regarding the mechanisms underlying decreased Na⁺,K⁺-ATPase activity after CM, it has been known that modulation of enzymatic activity may occur through α subunit Ser⁹⁴³ phosphorylation, by the action of cAMP-dependent protein kinase (PKA) (Cheng et al., 1997a, Cheng et al., 1997b). In fact, Cheng and coworkers (1997b) found that the magnitude of phosphorylation at this site linearly correlates with the decrease of enzyme activity. Our present results are in agreement with this fact, since phosphorylation at Ser⁹⁴³ increased long-term after CM, concomitantly to a decrease of Na⁺,K⁺-ATPase activity. In addition, these data is

in line with the view that changes in neuronal cellular cascades may persist in the brain of mice even after remission of CM (Maneerat et al., 2000, Dai et al., 2012, Guha et al., 2014).

Superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and lipids peroxide are reactive oxygen species considered important mediators of brain injury, and are released by recruited active monocytes and neutrophils, as a kind of host immune system response for the malarial infection (Narsaria et al., 2012). The hypoxiareoxygenation, caused by sequestration of parasitized red blood cells in cerebral microvessels and free heme release by rupture of schizonts, produces reactive oxygen species, that, along with cytokines and excitatory amino acids, lead to protein insults and contributes with damage to brain cells (Hunt et al., 2006, Narsaria et al., 2012). Oxidation of membrane proteins and lipids during severe oxidative stress may contribute to other mechanisms of brain injury, such as mitochondrial dysfunction, proteosomal dysfunction and inflammation (Dringen et al., 2005, Patel, 2016). In our study, PbA-infected mice showed an increase in oxidative stress in the hippocampus. This may lead to oxidative modifications of sensitive targets such as Na⁺,K⁺-ATPase and GABA_A receptors, may contributing to the deficits seen in the nesting and burying tests. In addition, increased protein carbonylation has been suggested to play a role in seizure activity (Patel, 2016). Accordingly, compelling evidence has linked oxidative stress with tissue damage and or with behavioral dysfunction in several neurological disorders models, including CM (Reis et al., 2010).

Although there have been no histological changes in the hippocampus region of PbA-infected mice at the 46th dpi, these data is in accordance with other studies that have demonstrated similar results (i.e. lack of significant histopathological changes), including a model of mild murine malaria (Guha et al., 2014) as well as in CM (Dai et al., 2010). Of note, in the study by Guha and colleagues (2014) hippocampal microglia numbers increased, whereas a decline in progenitor turnover and survival was observed at peak of parasitemia and returned to normal fifteen days post-parasite clearance.

Summarizing, the present study shows that selected behavioral and neurochemical parameters remain altered in the brain of mice even after successful

antimalarial therapy. Interestingly, no gross histological changes were observed. The increase of phosphorylated Na⁺,K⁺-ATPase at Ser⁹⁴³ as well as the decrease in benzodiazepine/GABA_A binding may help to explain the behavioral alterations showed in our study, as well as the susceptibility to seizures as previous work presented (Grauncke et al., 2016).

Conclusions

In our work, we showed neurochemical and behavioral changes similar to that observed in clinical patients after parasitemia clearance and CM recovery. However, additional studies are necessary to evaluate whether the presently-reported molecular mechanisms may constitute targets for neuroprotection and prevention of neurological sequelae after cure of CM.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (grants #304708/2015-1, #471666/2013-0 and #305956/2012-4) and from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs) (grant #2349-2551/14-5). The authors gratefully acknowledge the student fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (to L.R.R and F.B), CNPq/Pibic (to A.C.B.G. and F.K.M.) and Fapergs/Probic (to T.L.S.). M.S.O. and F.S.M are grantees of CNPq research productivity fellowships.

Competing interests and ethical statement

The authors have no conflicts of interest to disclose. We confirm that we have read the Journal's position on issues involved in ethical publication and affirm that this report is consistent with those guidelines.

Author's contributions

M.S.O. and L.R.R. conceived the project, coordinated the study, analyzed the data and edited the manuscript. A.C.B.G. and T.L.S performed CM animal model, designed experiments, carried out analyses involving immunohistological staining and biochemical tests, analyzed the data, and drafted the manuscript. F.K.M contributed to experimental CM procedures, and conducted part of the behavioral tests. S.M.O performed [³H]-Flunitrazepam binding assay and drafted the manuscript. F.S.M and F.B provided ANKA strain, gave technical support and conceptual advice and drafted the manuscript. All authors read and approved the final version.

References

- Azarias G, Kruusmagi M, Connor S, Akkuratov EE, Liu XL, Lyons D, Brismar H, Broberger C, Aperia A (2013) A specific and essential role for Na,K-ATPase alpha3 in neurons co-expressing alpha1 and alpha3. *J Biol Chem* 288:2734-2743.
- Benarroch EE (2011) Na⁺, K⁺-ATPase: functions in the nervous system and involvement in neurologic disease. *Neurology* 76:287-293.
- Buckmaster PS, Lew FH (2011) Rapamycin suppresses mossy fiber sprouting but not seizure frequency in a mouse model of temporal lobe epilepsy. *J Neurosci* 31:2337-2347.
- Cheng XJ, Fisone G, Aizman O, Aizman R, Levenson R, Greengard P, Aperia A (1997a) PKA-mediated phosphorylation and inhibition of Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase in response to beta-adrenergic hormone. *Am J Physiol* 273:C893-901.
- Cheng XJ, Hoog JO, Nairn AC, Greengard P, Aperia A (1997b) Regulation of rat Na⁽⁺⁾-K⁽⁺⁾-ATPase activity by PKC is modulated by state of phosphorylation of Ser943 by PKA. *Am J Physiol* 273:C1981-1986.
- Dai M, Freeman B, Shikani HJ, Bruno FP, Collado JE, Macias R, Reznik SE, Davies P, Spray DC, Tanowitz HB, Weiss LM, Desruisseaux MS (2012) Altered regulation of Akt signaling with murine cerebral malaria, effects on long-term neuro-cognitive function, restoration with lithium treatment. *PLoS One* 7:e44117.

Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, Desruisseaux MS (2010) Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microbes Infect* 12:1198-1207.

de Oliveira CC, de Oliveira CV, Grigoletto J, Ribeiro LR, Funck VR, Grauncke AC, de Souza TL, Souto NS, Furian AF, Menezes IR, Oliveira MS (2016) Anticonvulsant activity of beta-caryophyllene against pentylenetetrazol-induced seizures. *Epilepsy Behav* 56:26-31.

Deacon R (2012) Assessing burrowing, nest construction, and hoarding in mice. *J Vis Exp* e2607.

Deacon RM (2006) Digging and marble burying in mice: simple methods for in vivo identification of biological impacts. *Nat Protoc* 1:122-124.

Deacon RM, Croucher A, Rawlins JN (2002) Hippocampal cytotoxic lesion effects on species-typical behaviours in mice. *Behav Brain Res* 132:203-213.

Dringen R, Pawlowski PG, Hirrlinger J (2005) Peroxide detoxification by brain cells. *J Neurosci Res* 79:157-165.

Freeman BD, Martins YC, Akide-Ndunge OB, Bruno FP, Wang H, Tanowitz HB, Spray DC, Desruisseaux MS (2016) Endothelin-1 Mediates Brain Microvascular Dysfunction Leading to Long-Term Cognitive Impairment in a Model of Experimental Cerebral Malaria. *PLoS Pathog* 12:e1005477.

Funck VR, Ribeiro LR, Pereira LM, de Oliveira CV, Grigoletto J, Della-Pace ID, Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Larrick JW, Oliveira MS (2015) Contrasting effects of Na⁺, K⁺-ATPase activation on seizure activity in acute versus chronic models. *Neuroscience* 298:171-179.

Funck VR, Ribeiro LR, Pereira LM, de Oliveira CV, Grigoletto J, Figuera MR, Royes LF, Furian AF, Oliveira MS (2014) Long-term decrease in Na⁺,K⁺-ATPase activity after pilocarpine-induced status epilepticus is associated with nitration of its alpha subunit. *Epilepsy Res* 108:1705-1710.

Grauncke AC, Souza TL, Ribeiro LR, Brant F, Machado FS, Oliveira MS (2016) Increased susceptibility to pentylentetrazol following survival of cerebral malaria in mice. *Epilepsia* 57:e140-145.

Gravielle MC (2016) Activation-induced regulation of GABAA receptors: Is there a link with the molecular basis of benzodiazepine tolerance? *Pharmacol Res* 109:92100.

Grigoletto J, Oliveira CV, Grauncke AC, Souza TL, Souto NS, Freitas ML, Furian AF, Santos AR, Oliveira MS (2016) Rosmarinic acid is anticonvulsant against seizures induced by pentylentetrazol and pilocarpine in mice. *Epilepsy Behav* 62:27-34.

Gu Q, Schmued LC, Sarkar S, Paule MG, Raymick B (2012) One-step labeling of degenerative neurons in unfixed brain tissue samples using Fluoro-Jade C. *J Neurosci Methods* 208:40-43.

Guha SK, Tillu R, Sood A, Patgaonkar M, Nanavaty IN, Sengupta A, Sharma S, Vaidya VA, Pathak S (2014) Single episode of mild murine malaria induces neuroinflammation, alters microglial profile, impairs adult neurogenesis, and causes deficits in social and anxiety-like behavior. *Brain Behav Immun* 42:123-137.

Hunt NH, Golenser J, Chan-Ling T, Parekh S, Rae C, Potter S, Medana IM, Miu J, Ball HJ (2006) Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int J Parasitol* 36:569-582.

Hunt NH, Grau GE, Engwerda C, Barnum SR, van der Heyde H, Hansen DS, Schofield L, Golenser J (2010) Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends Parasitol* 26:272-274.

Idro R, Kakooza-Mwesige A, Balyejjussa S, Mirembe G, Mugasha C, Tugumisirize J, Byarugaba J (2010a) Severe neurological sequelae and behaviour problems after cerebral malaria in Ugandan children. *BMC Res Notes* 3:104.

Idro R, Marsh K, John CC, Newton CR (2010b) Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res* 68:267274.

Ikumi ML, Muchohi SN, Ohuma EO, Kokwaro GO, Newton CR (2008) Response to diazepam in children with malaria-induced seizures. *Epilepsy Res* 82:215-218.

- Illarionova NB, Brismar H, Aperia A, Gunnarson E (2014) Role of Na,K-ATPase alpha1 and alpha2 isoforms in the support of astrocyte glutamate uptake. *PLoS One* 9:e98469.
- John CC, Bangirana P, Byarugaba J, Opoka RO, Idro R, Jurek AM, Wu B, Boivin MJ (2008) Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics* 122:e92-99.
- Kinoshita PF, Leite JA, Orellana AM, Vasconcelos AR, Quintas LE, Kawamoto EM, Scavone C (2016) The Influence of Na(+), K(+)-ATPase on Glutamate Signaling in Neurodegenerative Diseases and Senescence. *Front Physiol* 7:195.
- Kokwaro G, Edwards G, Roberts P, Ward S, Winstanley P, Watkins W (1997) Infection with *Plasmodium berghei* alters benzodiazepine receptor in rat brain. *Arch Med Res* 28:425-427.
- Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, Vilela MC, Miranda AS, Amaral DC, Camargos ER, Carvalho LJ, Howe CL, Teixeira MM, Teixeira AL (2010) Inflammatory changes in the central nervous system are associated with behavioral impairment in *Plasmodium berghei* (strain ANKA)-infected mice. *Exp Parasitol* 125:271-278.
- Lamb TJ, Brown DE, Potocnik AJ, Langhorne J (2006) Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 8:1-22.
- Lou J, Lucas R, Grau GE (2001) Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin Microbiol Rev* 14:810820, table of contents.
- Luhrs L, Manlapaz C, Kedzie K, Rao S, Cabrera-Ghayouri S, Donello J, Gil D (2016) Function of brain alpha2B-adrenergic receptor characterized with subtype-selective alpha2B antagonist and KO mice. *Neuroscience* 339:608-621.
- Maneerat Y, Viriyavejakul P, Punpoowong B, Jones M, Wilairatana P, Pongponratn E, Turner GD, Udomsangpetch R (2000) Inducible nitric oxide synthase expression is increased in the brain in fatal cerebral malaria. *Histopathology* 37:269-277.
- Ming GL, Song H (2005) Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 28:223-250.

Nacer A, Movila A, Baer K, Mikolajczak SA, Kappe SH, Frevort U (2012) Neuroimmunological blood brain barrier opening in experimental cerebral malaria. *PLoS Pathog* 8:e1002982.

Narsaria N, Mohanty C, Das BK, Mishra SP, Prasad R (2012) Oxidative stress in children with severe malaria. *J Trop Pediatr* 58:147-150.

Nichols JN, Deshane AS, Niedzielko TL, Smith CD, Floyd CL (2016) Greater neurobehavioral deficits occur in adult mice after repeated, as compared to single, mild traumatic brain injury (mTBI). *Behav Brain Res* 298:111-124.

Opoka RO, Bangirana P, Boivin MJ, John CC, Byarugaba J (2009) Seizure activity and neurological sequelae in Ugandan children who have survived an episode of cerebral malaria. *Afr Health Sci* 9:75-81.

Orta-Salazar E, Feria-Velasco A, Medina-Aguirre GI, Diaz-Cintra S (2013) [Morphological analysis of the hippocampal region associated with an innate behaviour task in the transgenic mouse model (3xTg-AD) for Alzheimer disease]. *Neurologia* 28:497-502.

Patel M (2016) Targeting Oxidative Stress in Central Nervous System Disorders. *Trends Pharmacol Sci* 37:768-778.

Reis PA, Comim CM, Hermani F, Silva B, Barichello T, Portella AC, Gomes FC, Sab IM, Frutuoso VS, Oliveira MF, Bozza PT, Bozza FA, Dal-Pizzol F, Zimmerman GA, Quevedo J, Castro-Faria-Neto HC (2010) Cognitive dysfunction is sustained after rescue therapy in experimental cerebral malaria, and is reduced by additive antioxidant therapy. *PLoS Pathog* 6:e1000963.

Reis PA, Estado V, da Silva TI, d'Avila JC, Siqueira LD, Assis EF, Bozza PT, Bozza FA, Tibirica EV, Zimmerman GA, Castro-Faria-Neto HC (2012) Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog* 8:e1003099.

Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, Hafezparast M, Latcham J, Robinson TL, Quilter CA, Fisher EM (2001) SHIRPA, a protocol for

behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neurosci Lett* 306:89-92.

Romero-Calvo I, Ocon B, Martinez-Moya P, Suarez MD, Zarzuelo A, MartinezAugustin O, de Medina FS (2010) Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. *Anal Biochem* 401:318-320.

Rose EM, Koo JC, Antflick JE, Ahmed SM, Angers S, Hampson DR (2009) Glutamate transporter coupling to Na,K-ATPase. *J Neurosci* 29:8143-8155.

Royes LF, Gabbi P, Ribeiro LR, Della-Pace ID, Rodrigues FS, de Oliveira Ferreira AP, da Silveira Junior ME, da Silva LR, Grisolia AB, Braga DV, Dobrachinski F, da Silva AM, Soares FA, Marchesan S, Furian AF, Oliveira MS, Figuera MR (2016) A neuronal disruption in redox homeostasis elicited by ammonia alters the glycine/glutamate (GABA) cycle and contributes to MMA-induced excitability. *Amino Acids* 48:1373-1389.

WHO (2015) World Malaria Report. p 280 Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Figures and Tables

Behavioral Parameters	Control	PbA-infected
Open field		
Crossings	93.00 ± 19.05	111.6 ± 25.52
Rearing responses	30.00 ± 9.950	33.20 ± 9.346
Grooming responses	3.000 ± 0.4082	3.200 ± 0.3742
Time spent in center (%)	4.645 ± 1.590	6.314 ± 1.803
Rota-rod		
Latency to fall (s)	189.0 ± 51.00	145.8 ± 48.08
Sucrose Preference		
24 h consumption (%)	76.01 ± 6.274	77.27 ± 3.251
48 h consumption (%)	73.87 ± 2.144	78.27 ± 4.984

Table 1. Effect of CM on selected behavioral parameters. Data are presented as mean ± S.E.M for control (n = 4) and infected (n = 5) groups. Statistical analyses were performed with two-tailed unpaired Student's t-test.

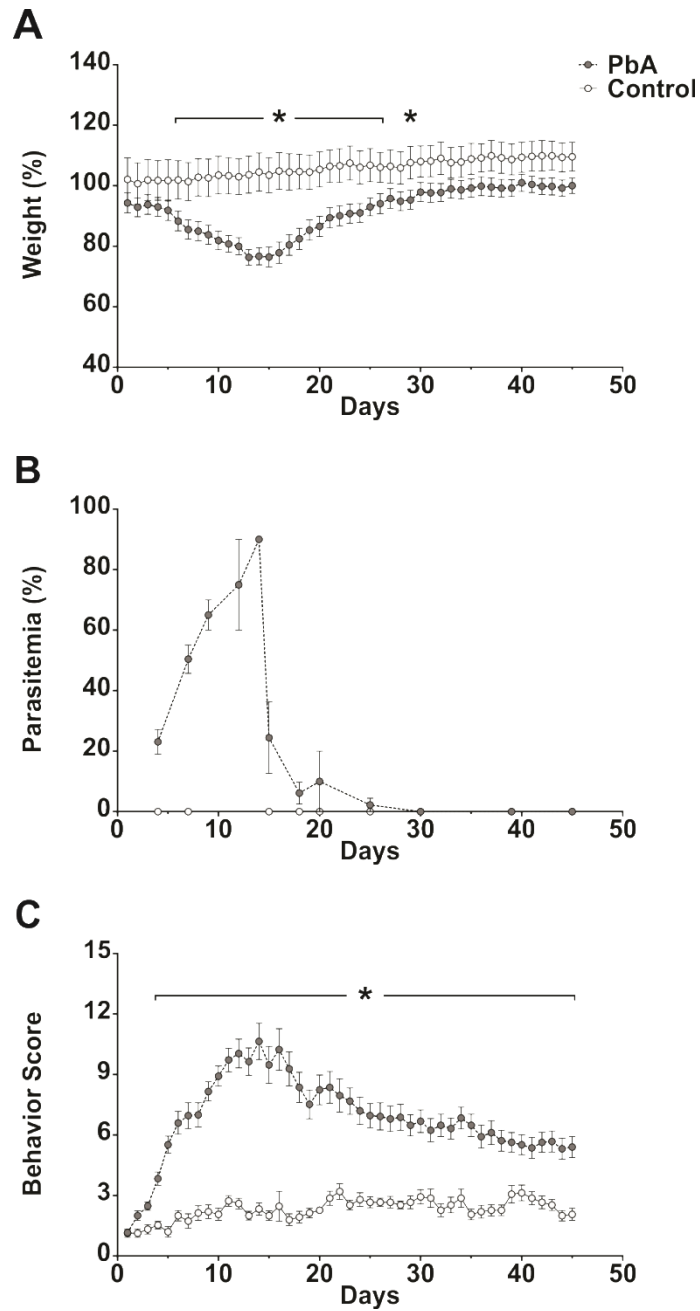


Figure 1. Time course of CM development in C57BL/6 adult male mice. (A) Weight percentage variation according to initial data value, (B) percentage of red blood infected cells and (C) total individual behavior scores during chronic *Plasmodium berghei* ANKA infection induced in C57BL/6 mice. Comparisons between infected ($n = 25$) and control ($n = 15-18$) group were significant by two-way ANOVA test, followed by Fisher's LSD test when necessary, and * indicates $p < 0.05$.

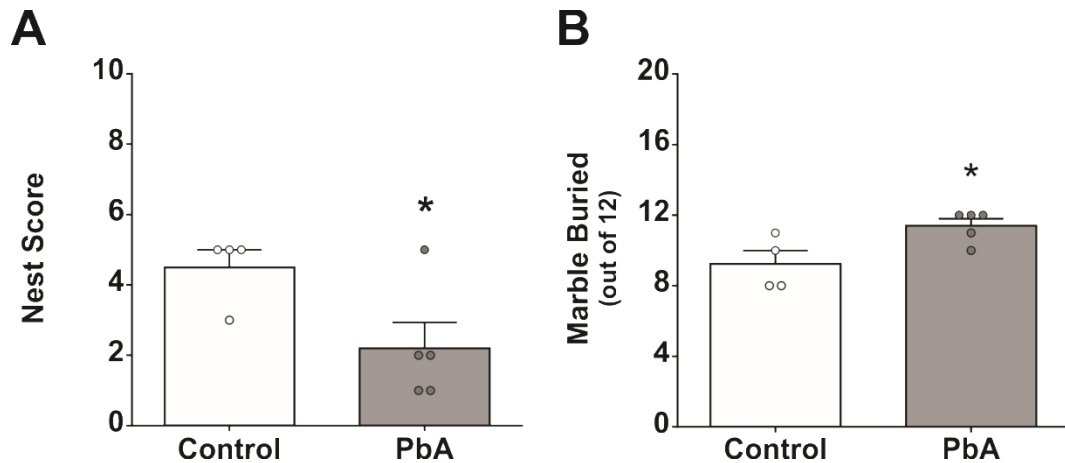


Figure 2. Effects of CM on natural behavior of C57Bl/6 mice. (A) Nest building score and (B) number of marbles buried by C57BL/6 mice after infection recovery. Comparisons between infected (n = 5) and control (n = 4) group were analyzed by unpaired t test. Data are expressed as mean \pm SEM and * indicates $p < 0.05$.

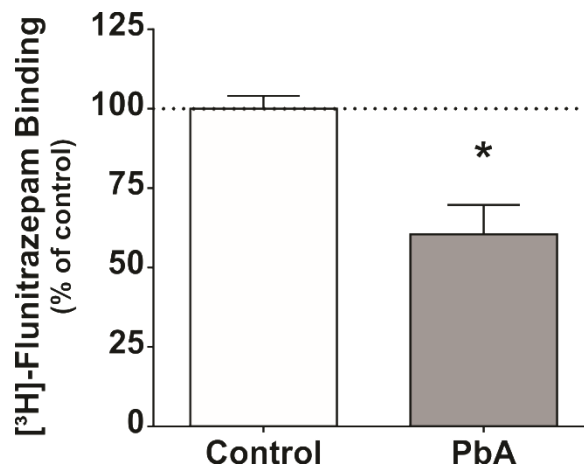


Figure 3. Determination of GABA_A binding capacity through [³H]-Flunitrazepam. This set of experiment was carried out in cerebral cortex of C57BL/6 mice after infection recovery and analyzed as percentage of control group. Comparisons between infected (n = 4) and control (n = 3) group were analyzed by unpaired t test. Data were expressed as mean \pm SEM and * indicates $p < 0.05$.

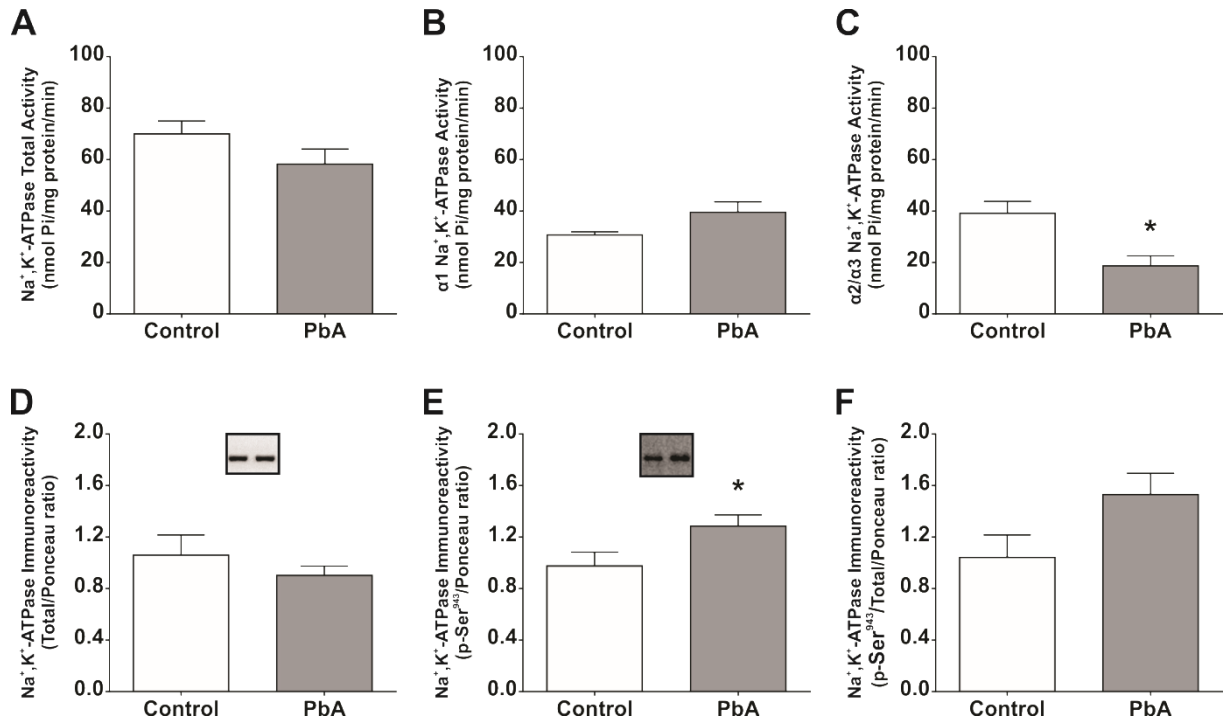


Figure 4. Determination of Na⁺,K⁺-ATPase content, specific Ser⁹⁴³ phosphorylation and enzyme activity. This set of experiment was carried out in cerebral cortex of C57BL/6 mice after infection recovery and intended to evaluate (A) total, (B) α1 and (C) α2/α3 Na⁺,K⁺-ATPase activities. Moreover, (D) total Na⁺,K⁺-ATPase α subunit, (E) Na⁺,K⁺-ATPase α subunit phosphorylated at Ser⁹⁴³ and (F) ratio between p-Ser⁹⁴³ and total content were measured. Comparisons between infected (n = 4-12) and control (n = 4-6) group were analyzed by unpaired t test. Data were expressed as mean ± SEM and * indicates p < 0.05.

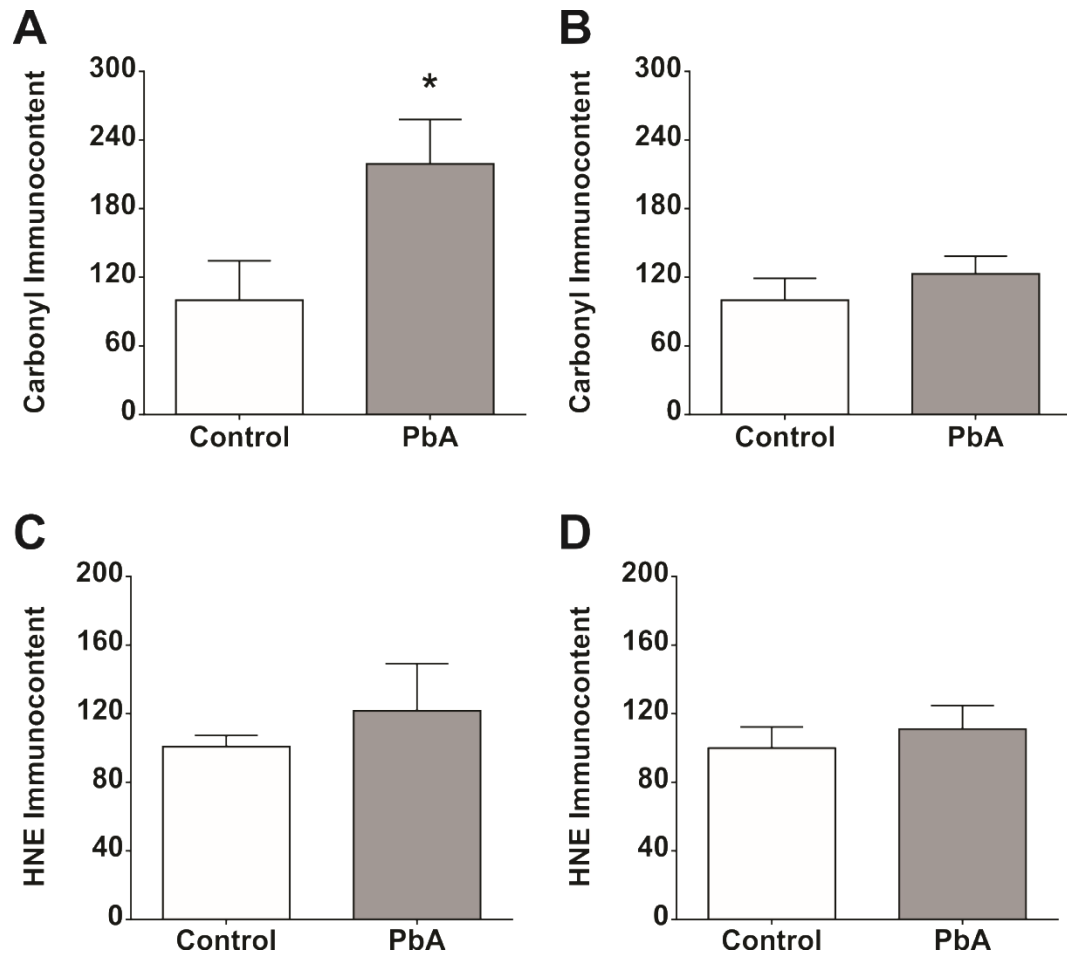


Figure 5. Expression of oxidative stress markers. Oxidative damage was assessed by measuring protein Carbonyl (A and B) and protein-HNE (C and D) in hippocampus and cerebral cortex, respectively, of C57BL/6 mice after malaria infection recovery. Comparisons between infected (n = 6) and control (n = 6-8) group were analyzed by unpaired t test. Data were expressed as mean \pm SEM and * indicates $p < 0.05$.

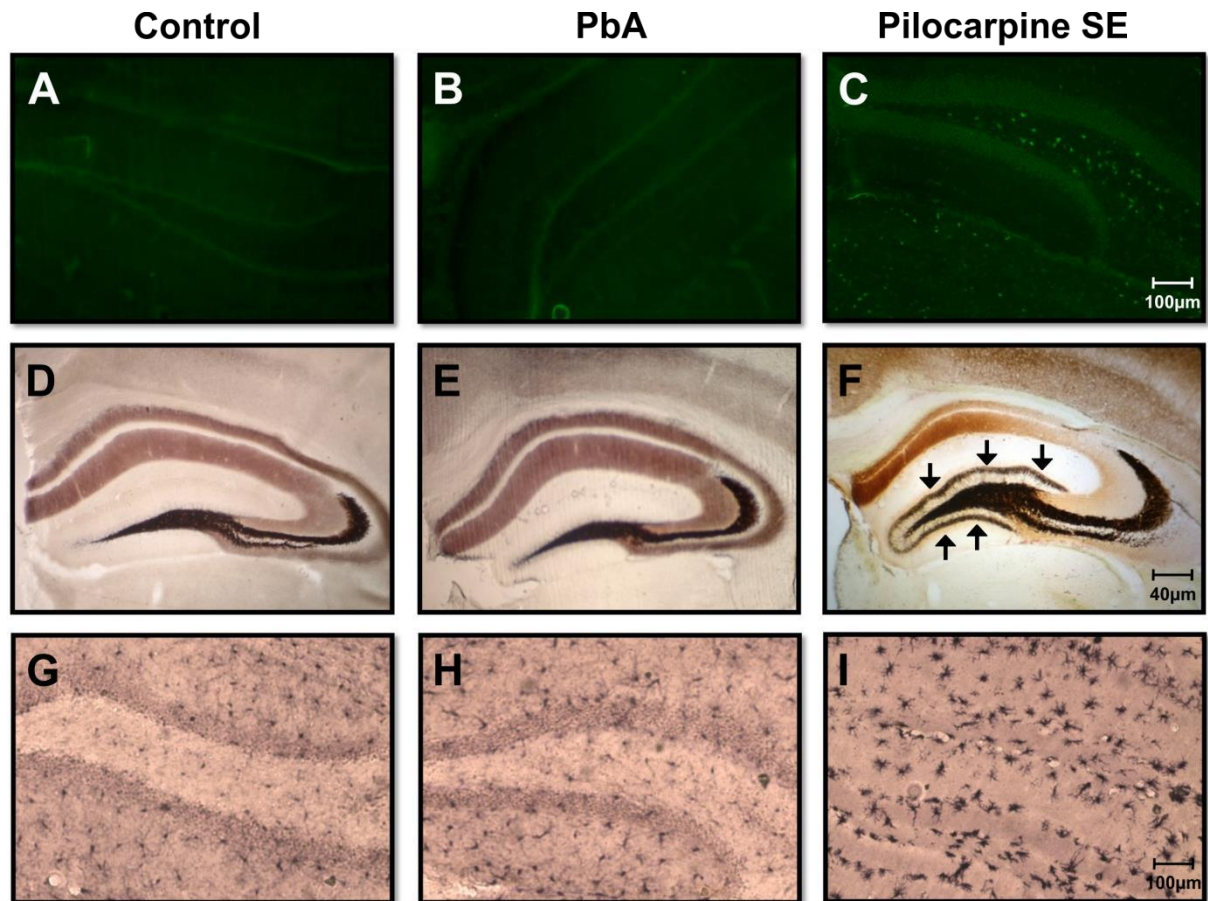


Figure 6: Histological analysis of infected mice strain after CM recovery. FJC staining (A, B and C), Timm staining (D, E and F) and IBA-1 immunoreactivity (G, H and I) were performed in hippocampus of non-infected controls (A, D and G), PbA-infected (B, E and H) and pilocarpine-generated epileptic mice (positive control) (C, F and I). FJC and Timm staining in PbA-infected mice, as well as, IBA-1 marker was indistinguishable from non-infected controls. Arrows in panel F indicate typical aberrant Timm staining in the dentate gyrus of epileptic mice.

4. CONCLUSÃO

Conforme os resultados apresentados neste trabalho, é possível inferir que danos comportamentais persistem mesmo após a eliminação do protozoário da circulação sanguínea e remissão da doença. Estes danos observados podem ser relacionados com alterações bioquímicas e moleculares encontradas tanto em amostras de córtex cerebral quanto de hipocampo de animais infectados.

Os alvos de estudo do presente trabalho, os quais podem estar envolvidos no desenvolvimento das sequelas relacionadas ao estabelecimento da MC, tais como as alterações comportamentais apresentadas aqui e a susceptibilidade a crises convulsivas apresentadas em estudo prévio do nosso grupo (GRAUNCKE et al., 2016) podem ser observados na figura 4.

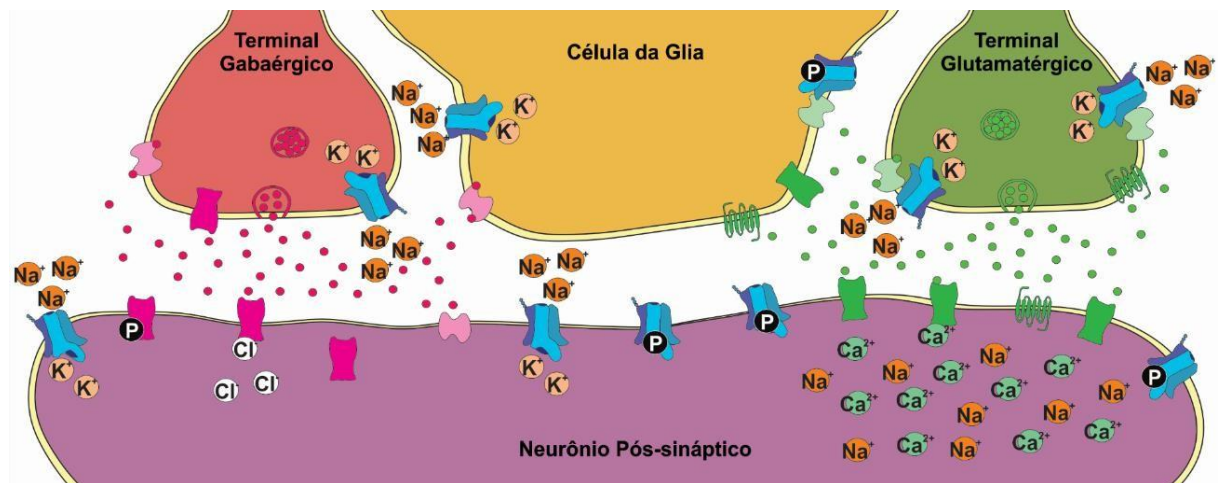


Figura 4. Alvos bioquímicos e moleculares que possam estar envolvidos com o desenvolvimento das sequelas observadas após remissão da MC.

A partir da diminuição da capacidade de ligação dos receptores GABA_A, podemos concluir que, provavelmente, há diminuição do efeito inibitório do neurotransmissor GABA, permitindo, assim, um aumento da taxa de excitabilidade à nível de SNC. Além disso, o aumento da excitabilidade do sistema também pode estar sendo influenciado pela diminuição da atividade da Na⁺,K⁺-ATPase, especificamente nas subunidades α2/α3. Respectivamente, estas subunidades são responsáveis, como descrito anteriormente, pela recaptação do glutamato da fenda sináptica e manutenção do potencial de ação celular. Sendo assim, em conjunto, estas vias levam ao aumento da excitabilidade do SNC, corroborando com achados clínicos e experimentais que descrevem a ocorrência de crises convulsivas mesmo após tratamento adequado com antimalárico.

Além disso, pôde ser observado um aumento da expressão de proteínas carboniladas no tecido hipocampal dos animais que desenvolveram a malária, uma vez que a infecção pode induzir a produção exacerbada de EROs no tecido cerebral. Estes achados no hipocampo podem ser relacionados com as alterações comportamentais apresentadas neste estudo através da diminuição da taxa de

construção de ninho e aumento da atividade dos animais no teste de Marble Burying. Esta produção exacerbada de EROs também pode estar relacionada às alterações observadas nos receptores GABA_A e na Na⁺,K⁺-ATPase no córtex cerebral dos animais com quadro de MC confirmado, contribuindo com o agravamento da doença através da hiperexcitabilidade do tecido que pode acentuar o estresse oxidativo.

Dessa forma, no presente trabalho foi possível observar a ocorrência de alterações comportamentais e neuroquímicas similares àquelas relatadas em pacientes mesmo após a eliminação dos parasitas e recuperação da MC. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar se os mecanismos moleculares reportados constituem novos biomarcadores de neuroproteção e prevenção de sequelas neurológicas após remissão da doença.

REFERÊNCIAS

AMANTE, F. H. ET AL. IMMUNE-MEDIATED MECHANISMS OF PARASITE TISSUE SEQUESTRATION DURING EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA. **J IMMUNOL**, V. 185, N. 6, P. 3632-42, SEP 15 2010.

AMOA ONGUENE, P. ET AL. THE POTENTIAL OF ANTI-MALARIAL COMPOUNDS DERIVED FROM AFRICAN MEDICINAL PLANTS, PART I: A PHARMACOLOGICAL EVALUATION OF ALKALOIDS AND TERPENOID. **MALAR J**, V. 12, P. 449, DEC 13 2013.

APERIA, A. REGULATION OF SODIUM/POTASSIUM ATPASE ACTIVITY: IMPACT ON SALT BALANCE AND VASCULAR CONTRACTILITY. **CURR HYPERTENS REP**, V. 3, N. 2, P. 165-71, APR 2001.

APERIA, A. NEW ROLES FOR AN OLD ENZYME: NA,K-ATPASE EMERGES AS AN INTERESTING DRUG TARGET. **J INTERN MED**, V. 261, N. 1, P. 44-52, JAN 2007.

APERIA, A. 2011 HOMER SMITH AWARD: TO SERVE AND PROTECT: CLASSIC AND NOVEL ROLES FOR NA⁺, K⁺ -ADENOSINE TRIPHOSPHATASE. **J AM SOC NEPHROL**, V. 23, N. 8, P. 1283-90, AUG 2012.

APERIA, A. ET AL. NA⁺-K⁺-ATPASE, A NEW CLASS OF PLASMA MEMBRANE RECEPTORS. **AM J PHYSIOL CELL PHYSIOL**, V. 310, N. 7, P. C491-5, APR 01 2016.

BAGAVAN, A. ET AL. IN VITRO ANTIMALARIAL ACTIVITY OF MEDICINAL PLANT EXTRACTS AGAINST PLASMODIUM FALCIPARUM. **PARASITOL RES**, V. 108, N. 1, P. 15-22, JAN 2011.

BAGOT, S. ET AL. SUSCEPTIBILITY TO EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA INDUCED BY PLASMODIUM BERGHEI ANKA IN INBRED MOUSE STRAINS RECENTLY DERIVED FROM WILD STOCK. **INFECT IMMUN**, V. 70, N. 4, P. 204956, APR 2002.

BARON, S. **MEDICAL MICROBIOLOGY**. 4TH. GALVESTON, TEX.: UNIVERSITY OF TEXAS MEDICAL BRANCH AT GALVESTON, 1996. XVII, 1273 P. ISBN 0963117211 (HARDCOVER).

BECKER, K. ET AL. OXIDATIVE STRESS IN MALARIA PARASITE-INFECTED ERYTHROCYTES: HOST-PARASITE INTERACTIONS. **INT J PARASITOL**, V. 34, N. 2, P. 163-89, FEB 2004.

BELUSA, R. ET AL. MUTATION OF THE PROTEIN KINASE C PHOSPHORYLATION SITE ON RAT ALPHA1 NA⁺,K⁺-ATPASE ALTERS REGULATION OF INTRACELLULAR NA⁺ AND PH AND INFLUENCES CELL SHAPE AND ADHESIVENESS. **J BIOL CHEM**, V. 272, N. 32, P. 20179-84, AUG 08 1997.

BONDI, F. S. THE INCIDENCE AND OUTCOME OF NEUROLOGICAL ABNORMALITIES IN CHILDHOOD CEREBRAL MALARIA: A LONG-TERM FOLLOW-UP OF 62 SURVIVORS. **TRANS R SOC TROP MED HYG**, V. 86, N. 1, P. 17-9, JAN-FEB 1992.

BOWERY, N. G.; ENNA, S. J. GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID(B) RECEPTORS: FIRST OF THE FUNCTIONAL METABOTROPIC HETERODIMERS. **J PHARMACOL EXP THER**, V. 292, N. 1, P. 2-7, JAN 2000.

BREWSTER, D. R.; KWIATKOWSKI, D.; WHITE, N. J. NEUROLOGICAL SEQUELAE OF CEREBRAL MALARIA IN CHILDREN. **LANCET**, V. 336, N. 8722, P. 1039-43, OCT 27 1990.

CAMPAGNA-SLATER, V.; WEAVER, D. F. MOLECULAR MODELLING OF THE GABAA ION CHANNEL PROTEIN. **J MOL GRAPH MODEL**, V. 25, N. 5, P. 721-30, JAN 2007.

CHIBALIN, A. V. ET AL. RECEPTOR-MEDIATED INHIBITION OF RENAL NA(+)K(+)-ATPASE IS ASSOCIATED WITH ENDOCYTOSIS OF ITS ALPHA- AND BETASUBUNITS. **AM J PHYSIOL**, V. 273, N. 5 PT 1, P. C1458-65, NOV 1997.

CROWLEY, T. ET AL. INHIBITING NEUROINFLAMMATION: THE ROLE AND THERAPEUTIC POTENTIAL OF GABA IN NEURO-IMMUNE INTERACTIONS. **BRAIN BEHAV IMMUN**, V. 54, P. 260-77, MAY 2016.

D'URSO, G. ET AL. CARDIOPROTECTION BY OUABAIN AND DIGOXIN IN PERFUSED RAT HEARTS. **J CARDIOVASC PHARMACOL**, V. 52, N. 4, P. 333-7, OCT 2008.

DAILYMED.

DOBRETSOV, M.; STIMERS, J. R. NEURONAL FUNCTION AND ALPHA3 ISOFORM OF THE NA/K-ATPASE. **FRONT BIOSCI**, V. 10, P. 2373-96, SEP 01 2005.

DONDORP, A. ET AL. ARTESUNATE VERSUS QUININE FOR TREATMENT OF SEVERE FALCIPARUM MALARIA: A RANDOMISED TRIAL. **LANCET**, V. 366, N. 9487, P. 717-25, AUG 27-SEP 2 2005.

DRONAMRAJU, K. R.; ARESE, P. **MALARIA : GENETIC AND EVOLUTIONARY ASPECTS**. NEW YORK, NY: SPRINGER, 2006. XI, 190 P. ISBN 9780387282947 0387282947.

ENNA, S. J.; MCCARSON, K. E. THE ROLE OF GABA IN THE MEDIATION AND PERCEPTION OF PAIN. **ADV PHARMACOL**, V. 54, P. 1-27, 2006.

FIOCRUZ. CLOROQUINA - ANTIMALÁRICO. **FARMANGUINHOS**, APRIL 20, 2016 2006. DISPONÍVEL EM: <
[HTTP://WWW.FAR.FIOCRUZ.BR/FARMANGUINHOS/IMAGES/STORIES/PHOCADOWNLOAD/CLOROQUINA.PDF](http://www.far.fiocruz.br/farmanguinhos/images/stories/phocadownload/cloroquina.pdf) >.

FIOCRUZ. AGÊNCIA FIOCRUZ DE NOTÍCIAS: SAÚDE E CIÊNCIA PARA TODOS. **MALÁRIA**, 2013. DISPONÍVEL EM: <
[HTTPS://AGENCIA.FIOCRUZ.BR/MAL%C3%A1RIA](https://agencia.fiocruz.br/mal%C3%A1ria) >. ACESSO EM: APRIL 18, 2016.

FUNCK, V. R. ET AL. LONG-TERM DECREASE IN Na^+ , K^+ -ATPASE ACTIVITY AFTER PILOCARPINE-INDUCED STATUS EPILEPTICUS IS ASSOCIATED WITH NITRATION OF ITS ALPHA SUBUNIT. **EPILEPSY RES**, V. 108, N. 10, P. 1705-10, DEC 2014.

GOLENSER, J. ET AL. INDUCTION OF OXIDANT STRESS BY IRON AVAILABLE IN ADVANCED FORMS OF PLASMODIUM FALCIPARUM. **FREE RADIC RES COMMUN**, V. 12-13 PT 2, P. 639-43, 1991.

GRAUNCKE, A. C. ET AL. INCREASED SUSCEPTIBILITY TO PENTYLENETETRAZOL FOLLOWING SURVIVAL OF CEREBRAL MALARIA IN MICE. **EPILEPSIA**, V. 57, N. 7, P. E140-5, JUL 2016.

GRISAR, T.; GUILLAUME, D.; DELGADO-ESCUETA, A. V. CONTRIBUTION OF Na^+ , K^+ -ATPASE TO FOCAL EPILEPSY: A BRIEF REVIEW. **EPILEPSY RES**, V. 12, N. 2, P. 141-9, JUL 1992.

HAYASHI, T. INHIBITION AND EXCITATION DUE TO GAMMA-AMINOBUTYRIC ACID IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM. **NATURE**, V. 182, N. 4642, P. 10767, OCT 18 1958.

HUNT, N. H. ET AL. IMMUNOPATHOGENESIS OF CEREBRAL MALARIA. **INT J PARASITOL**, V. 36, N. 5, P. 569-82, MAY 01 2006.

IDRO, R. ET AL. CEREBRAL MALARIA: MECHANISMS OF BRAIN INJURY AND STRATEGIES FOR IMPROVED NEUROCOGNITIVE OUTCOME. **PEDIATR RES**, V. 68, N. 4, P. 267-74, OCT 2010.

JORGENSEN, P. L.; HAKANSSON, K. O.; KARLISH, S. J. STRUCTURE AND MECHANISM OF Na^+ , K^+ -ATPASE: FUNCTIONAL SITES AND THEIR INTERACTIONS. **ANNU REV PHYSIOL**, V. 65, P. 817-49, 2003.

KALUEFF, A. V.; NUTT, D. J. ROLE OF GABA IN ANXIETY AND DEPRESSION. **DEPRESS ANXIETY**, V. 24, N. 7, P. 495-517, 2007.

KAPLAN, J. H. BIOCHEMISTRY OF Na^+ , K^+ -ATPASE. **ANNU REV BIOCHEM**, V. 71, P. 511-35, 2002.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **FARMACOLOGIA: BÁSICA & CLÍNICA**. 9ª EDIÇÃO. RIO DE JANEIRO: 2006.

KROGSGAARD-LARSEN, P.; EGEBJERG, J.; SCHOUSBOE, A. **GLUTAMATE AND GABA RECEPTORS AND TRANSPORTERS : STRUCTURE, FUNCTION AND PHARMACOLOGY**. LONDON ; NEW YORK: TAYLOR & FRANCIS, 2002. XII, 435 P. ISBN 0748408819 (ALK. PAPER).

LACERDA-QUEIROZ, N. ET AL. INFLAMMATORY CHANGES IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM ARE ASSOCIATED WITH BEHAVIORAL IMPAIRMENT IN PLASMODIUM BERGHEI (STRAIN ANKA)-INFECTED MICE. **EXP PARASITOL**, V. 125, N. 3, P. 271-8, JUL 2010.

LI, J. ET AL. LOW DOSES OF OUABAIN PROTECT FROM SERUM DEPRIVATION-TRIGGERED APOPTOSIS AND STIMULATE KIDNEY CELL PROLIFERATION VIA ACTIVATION OF NF-KAPPAB. **J AM SOC NEPHROL**, V. 17, N. 7, P. 1848-57, JUL 2006.

LIU, F.; SHANG, Y.; CHEN, S. Z. CHLOROQUINE POTENTIATES THE ANTICANCER EFFECT OF LIDAMYCIN ON NON-SMALL CELL LUNG CANCER CELLS IN VITRO. **ACTA PHARMACOL SIN**, V. 35, N. 5, P. 645-52, MAY 2014.

LOGVINENKO, N. S. ET AL. PHOSPHORYLATION BY PROTEIN KINASE C OF SERINE-23 OF THE ALPHA-1 SUBUNIT OF RAT NA⁺,K⁽⁺⁾-ATPASE AFFECTS ITS CONFORMATIONAL EQUILIBRIUM. **PROC NATL ACAD SCI U S A**, V. 93, N. 17, P. 9132-7, AUG 20 1996.

MARTINS, Y. C.; CARVALHO, L. J.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. CHALLENGES IN THE DETERMINATION OF EARLY PREDICTORS OF CEREBRAL MALARIA: LESSONS FROM THE HUMAN DISEASE AND THE EXPERIMENTAL MURINE MODELS. **NEUROIMMUNOMODULATION**, V. 16, N. 2, P. 134-45, 2009.

MCCARSON, K. E.; ENNA, S. J. GABA PHARMACOLOGY: THE SEARCH FOR ANALGESICS. **NEUROCHEM RES**, V. 39, N. 10, P. 1948-63, OCT 2014.

MISHRA, S. K.; NEWTON, C. R. DIAGNOSIS AND MANAGEMENT OF THE NEUROLOGICAL COMPLICATIONS OF FALCIPARUM MALARIA. **NAT REV NEUROL**, V. 5, N. 4, P. 189-98, APR 2009.

MS. MANUAL DE DIAGNÓSTICO DA LABORATORIAL DA MALÁRIA. JUNE 20, 2017 2005. DISPONÍVEL EM: <
[HTTP://BVSMS.SAUDE.GOV.BR/BVS/PUBLICACOES/MALARIA_DIAG_MANUAL_FINAL.PDF](http://BVSMS.SAUDE.GOV.BR/BVS/PUBLICACOES/MALARIA_DIAG_MANUAL_FINAL.PDF) >.

MS. **GUIA PRÁTICO DE TRATAMENTO DA MALÁRIA NO BRASIL**. SAÚDE, M. D. BRASÍLIA 2010.

MS. PLANO DE ELIMINAÇÃO DA MALÁRIA. 2015. DISPONÍVEL EM: < [HTTP://AGENCIABRASIL.EBC.COM.BR/GERAL/NOTICIA/2015-11/MINISTERIODA-SAUDE-LANCA-PLANO-DE-ELIMINACAO-DA-MALARIA-NO-BRASIL](http://agenciabrasil.ebc.com.br/geral/noticia/2015-11/ministerioda-saude-lanca-plano-de-eliminacao-da-malaria-no-brasil) >. ACESSO EM: APRIL 18, 2016.

MSF. MALÁRIA. 2015. DISPONÍVEL EM: < [HTTP://WWW.MSF.ORG.BR/O-QUEFAZEMOS/ATIVIDADES-MEDICAS/MALARIA](http://www.msf.org.br/o-que-fazemos/atividades-medicinas/malaria) >. ACESSO EM: APRIL 19, 2016.

MUNG'ALA-ODERA, V.; SNOW, R. W.; NEWTON, C. R. THE BURDEN OF THE NEUROCOGNITIVE IMPAIRMENT ASSOCIATED WITH PLASMODIUM FALCIPARUM MALARIA IN SUB-SAHARAN AFRICA. **AM J TROP MED HYG**, V. 71, N. 2 SUPPL, P. 64-70, AUG 2004.

NEILL, A. L.; HUNT, N. H. PATHOLOGY OF FATAL AND RESOLVING PLASMODIUM BERGHEI CEREBRAL MALARIA IN MICE. **PARASITOLOGY**, V. 105 (PT 2), P. 165-75, OCT 1992.

NEVES, D. P. ET AL. **PARASITOLOGIA HUMANA**. 11TH ED. SÃO PAULO: ATHENEU, 2005.

NEWTON, C. R.; HIEN, T. T.; WHITE, N. CEREBRAL MALARIA. **J NEUROL NEUROSURG PSYCHIATRY**, V. 69, N. 4, P. 433-41, OCT 2000.

OMS. **ESTRATÉGIA TÉCNICA MUNDIAL PARA O PALUDISMO 2016–2030**. SAÚDE, O. M. D. 2015.

ONUBR. OMS REVELA QUE CASOS DE MALÁRIA CAÍRAM 47% NO MUNDO. BRASIL REDUZ EM 75% A INCIDÊNCIA DA DOENÇA. 2014. DISPONÍVEL EM: < [HTTP://NACOESUNIDAS.ORG/OMS-REVELA-QUE-INFECCAO-DE-MALARIACAIU-47-NO-MUNDO-BRASIL-REDUZ-EM-75-A-INCIDENCIA-DA-DOENCA/](http://nacoesunidas.org/oms-revela-que-infeccao-de-malariacaiu-47-no-mundo-brasil-reduz-em-75-a-incidencia-da-doenca/) >.

OPOKA, R. O. ET AL. SEIZURE ACTIVITY AND NEUROLOGICAL SEQUELAE IN UGANDAN CHILDREN WHO HAVE SURVIVED AN EPISODE OF CEREBRAL MALARIA. **AFR HEALTH SCI**, V. 9, N. 2, P. 75-81, JUN 2009.

PERCARIO, S. ET AL. OXIDATIVE STRESS IN MALARIA. **INT J MOL SCI**, V. 13, N. 12, P. 16346-72, DEC 03 2012.

REIS, P. A. ET AL. COGNITIVE DYSFUNCTION IS SUSTAINED AFTER RESCUE THERAPY IN EXPERIMENTAL CEREBRAL MALARIA, AND IS REDUCED BY ADDITIVE ANTIOXIDANT THERAPY. **PLOS PATHOG**, V. 6, N. 6, P. E1000963, JUN 24 2010.

ROLAIN, J. M.; COLSON, P.; RAOULT, D. RECYCLING OF CHLOROQUINE AND ITS HYDROXYL ANALOGUE TO FACE BACTERIAL, FUNGAL AND VIRAL INFECTIONS IN THE 21ST CENTURY. **INT J ANTIMICROB AGENTS**, V. 30, N. 4, P. 297-308, OCT 2007.

SATTAR, M. A. ET AL. NEUROLOGICAL FINDINGS AND OUTCOME IN ADULT CEREBRAL MALARIA. **BANGLADESH MED RES COUNC BULL**, V. 35, N. 1, P. 15-7, APR 2009.

SBI. MALÁRIA. 2016. DISPONÍVEL EM: <
[HTTPS://WWW.INFECTOLOGIA.ORG.BR/PG/967/MALARIA](https://www.infectologia.org.br/pg/967/malaria)>. ACESSO EM:
 APRIL 19, 2016.

SCHIRMER, R. H. ET AL. OXIDATIVE STRESS AS A DEFENSE MECHANISM AGAINST PARASITIC INFECTIONS. **FREE RADIC RES COMMUN**, V. 3, N. 1-5, P. 3-12, 1987.

SCHLITZER, M. MALARIA CHEMOTHERAPEUTICS PART I: HISTORY OF ANTIMALARIAL DRUG DEVELOPMENT, CURRENTLY USED THERAPEUTICS, AND DRUGS IN CLINICAL DEVELOPMENT. **CHEMMEDCHEM**, V. 2, N. 7, P. 94486, JUL 2007.

SIBAROV, D. A. ET AL. NA⁺,K⁺-ATPASE FUNCTIONALLY INTERACTS WITH THE PLASMA MEMBRANE NA⁺,CA²⁺ EXCHANGER TO PREVENT CA²⁺ OVERLOAD AND NEURONAL APOPTOSIS IN EXCITOTOXIC STRESS. **J PHARMACOL EXP THER**, V. 343, N. 3, P. 596-607, DEC 2012.

SNOW, R. W.; TRAPE, J. F.; MARSH, K. THE PAST, PRESENT AND FUTURE OF CHILDHOOD MALARIA MORTALITY IN AFRICA. **TRENDS PARASITOL**, V. 17, N. 12, P. 593-7, DEC 2001.

SZABO, C. MULTIPLE PATHWAYS OF PEROXYNITRITE CYTOTOXICITY. **TOXICOL LETT**, V. 140-141, P. 105-12, APR 11 2003.

WHO. WORLD MALARIA REPORT. 2015. DISPONÍVEL EM: <
[HTTP://WWW.WHO.INT/MALARIA/PUBLICATIONS/WORLD-MALARIA-
REPORT2015/REPORT/EN/](http://www.who.int/malaria/publications/world-malaria-report2015/report/en/)>.

WINSTANLEY, P. A. CHEMOTHERAPY FOR FALCIPARUM MALARIA: THE
ARMOURY, THE PROBLEMS AND THE PROSPECTS. **PARASITOL TODAY**, V.
16, N. 4, P. 146-53, APR 2000.

ANEXO A

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM**

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Estudo das alterações eletrofisiológicas e bioquímicas precipitadas pela malária cerebral."

Número do Parecer: 020/2014

Pesquisador Responsável: Prof. Dr. Mauro Schneider Oliveira

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 07/05/2014.

Santa Maria, 07 de maio de 2014.

Prof.^a Dr.^a Vania Lucia Loro
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM

ANEXO B

Your recent submission to NSC

Neuroscience, Editorial <eesserver@eesmail.elsevier.com>

qua 21/06/2017 02:50

Para:thaize.lopes@hotmail.com <thaize.lopes@hotmail.com>;

Dear Dr. Thaize Souza,

You have been listed as a Co-Author of the following submission:

Journal: Neuroscience

Corresponding Author: Leandro Ribeiro

Co-Authors: Thaize L Souza; Ana Claudia B Grauncke; Fernanda K Mello; Sara M Oliveira; Fátima Brant; Fabiana S Machado; Mauro S Oliveira

Title: Cerebral malaria causes enduring behavioral and molecular changes in mice brain without causing gross histopathological damage

If you did not co-author this submission, please contact the Corresponding Author of this submission at leandrorodrigoribeiro@yahoo.com.br;leandrorodrigoribeiro@gmail.com; do not follow the link below.

An Open Researcher and Contributor ID (ORCID) is a unique digital identifier to which you can link your published articles and other professional activities, providing a single record of all your research.

We would like to invite you to link your ORCID ID to this submission. If the submission is accepted, your ORCID ID will be linked to the final published article and transferred to CrossRef. Your ORCID account will also be updated.

To do this, visit our dedicated page in EES. There you can link to an existing ORCID ID or register for one and link the submission to it:

<https://ees.elsevier.com/nsc/l.asp?i=859106&l=GUXP2FN0>

More information on ORCID can be found on the ORCID website, <http://www.ORCID.org>, or on our help page: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/2210/p/7923

Like other Publishers, Elsevier supports ORCID - an open, non-profit, community based effort - and has adapted its submission system to enable authors and co-authors to connect their submissions to their unique ORCID IDs.

Thank you,

Neuroscience

ANEXO C

Eisvier Editorial System | Seguro | <https://ees.elsevier.com/nsc/default.asp?acw=8&utt=1a250f5a6c34a5107538776011b6876d32e940-umHY> | Version: EES 2017.6

NEUROSCIENCE

[home](#) | [main menu](#) | [submit paper](#) | [guide for authors](#) | [register](#) | [change details](#) | [log out](#) | [Contact us](#) | [Help ?](#)
 Username: [leandrorodriigoribeiro@yahoo.com.br](#) | Switch To: [Author](#) | Go to: [MY EES HUB](#)

Submissions Being Processed for Author Leandro Rodrigo Ribeiro, Ph.D. in Biochemistry

Page: 1 of 1 (1 total submissions) | Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission	NSC-17-1069	Cerebral malaria causes enduring behavioral and molecular changes in mice brain without causing gross histopathological damage	06/21/2017	06/26/2017	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) | Display 10 results per page.

[<- Author Main Menu](#)

[Help](#) | [Privacy Policy](#) | [Terms and Conditions](#) | [About Us](#)
 Copyright © 2017 Elsevier B.V. All rights reserved. Cookies are set by this site. To decline them or learn more, visit our [Cookies](#) page.

EN | 10:50