



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE NEUROFARMACOLOGIA EXPERIMENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**MELATONINA PREVINE DANOS CEREBRAIS E DÉFICITS NEUROCOGNITIVOS
INDUZIDOS PELA INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* ANKA EM MODELO
MURINO DE MALÁRIA CEREBRAL**

BRENDA JAQUELINE DE AZEVEDO ATAIDE

BELÉM-PA

2021

BRENDA JAQUELINE DE AZEVEDO ATAIDE

**MELATONINA PREVINE DANOS CEREBRAIS E DÉFICITS NEUROCOGNITIVOS
INDUZIDOS PELA INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* ANKA EM MODELO
MURINO DE MALÁRIA CEREBRAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará como requisito final para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular

Orientadora: Prof. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira.

BELÉM-PA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

A862m Ataide, Brenda Jaqueline de Azevedo.
Melatonina previne danos cerebrais e déficits
neurocognitivos induzidos pela infecção por *Plasmodium*
berghei ANKA em modelo murino de malária cerebral /
Brenda Jaqueline de Azevedo Ataide. — 2021.
83 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Karen Renata Herculano Matos
Oliveira

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-
Graduação em Neurociências e Biologia celular, Belém,
2021.

1. Malária cerebral. 2. Melatonina. 3. Barreira
hematoencefálica. 4. Comprometimento
neurocomportamental. 5. *Plasmodium*. I. Título.

CDD 616.83

BRENDA JAQUELINE DE AZEVEDO ATAIDE

**MELATONINA PREVINE DANOS CEREBRAIS E DÉFICITS NEUROCOGNITIVOS
INDUZIDOS PELA INFECÇÃO POR *Plasmodium berghei* ANKA EM MODELO
MURINO DE MALÁRIA CEREBRAL**

Orientadora: Prof. Dra. Karen Renata
Herculano Matos Oliveira

Banca examinadora:

Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará

Prof. Dr. Carlomagno Pacheco Bahia
Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará

BELÉM-PA

2021

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará sob orientação da Prof^a. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira. A realização da pesquisa contou com o apoio das seguintes instituições de fomento: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) e Fundação Amazônia Amparo a Estudos e Pesquisas (Fapespa).

Dedico esta monografia,

A Deus, que me concedeu vida e saúde, à minha família que sempre torceu pelo meu sucesso e, em especial, à minha mãe que sonha os meus sonhos e me dá forças todos os dias para alcançar os meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar muito mais do que preciso e me abençoar muito mais do que mereço.

À minha orientadora, Prof. Dra. Karen Oliveira, por quem eu tenho um enorme carinho e admiração, por ter sido sempre incansável quando o assunto é ofertar a melhor formação aos alunos, pela paciência que quase sempre foi exigida, por ter me acolhido quando eu era apenas uma caloura e ter me permitido trabalhar com o que amo há 6 anos.

Ao Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano, por ter sido de extrema importância na formação acadêmica, pelas discussões produtivas e pelas contribuições no meu trabalho.

À minha mãe, Helena, por ser minha maior incentivadora, por dedicar sua vida a mim e me ensinar os valores que trago comigo. És a maior responsável por tudo o que eu já conquistei ao longo da vida e eu não poderia ser mais grata por te ter ao meu lado. Te amo!

Ao meu pai, Jamilson, pelo amor e por se fazer tão presente na minha vida.

Aos meus tios e tias, Cleiton, Carlos, José Orlando, José Maria, Arnaldo, Graça, Jô, Elisangela e todos os demais, por terem ajudado e me acompanhado de tão perto durante esses 2 anos. Vocês tornaram tudo mais fácil e me mostraram que família é sim a base de tudo.

À Lilian Caroline e à Natalia Matos, minhas irmãs, pela compreensão das minhas faltas, pelo amor, apoio e por tudo o que fizeram e fazem por mim. Não tenho palavras para descrever o quanto sou grata pela vida de vocês.

À Nayara, Nívia, Larissa e Marjorie. Vocês são um exemplo do que um grupo deve ser. Obrigada pelo companheirismo, pela ajuda nos experimentos e por não medirem esforços para me ajudar. Vocês têm toda a minha admiração e carinho.

Ao Amarildo Gomes, por toda ajuda ao longo do desenvolvimento do trabalho.

Aos meus amigos e colegas do LNE por todos os momentos divididos durante esses anos.

Aos demais professores do LNE, Evander, Adelaide e Suelen, pelas contribuições valiosas para o desenvolvimento do trabalho.

Ao Laboratório de Neurofarmacologia Experimental, ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular e à Universidade Federal do Pará.

À FAPESPA, CNPq e CAPES pelo fomento financeiro.

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para realização desse trabalho e concretização desse grande sonho.

Meu muito obrigada a todos!

“As mulheres que são capazes de mudar o mundo não precisam mostrar nada além da sua inteligência...”.

(Rita Levi-Montalcini)

RESUMO

A malária cerebral é caracterizada por deficiências cognitivas permanentes em crianças infectadas com *Plasmodium*. As terapias antimaláricas mostram pouca eficácia para evitar déficits neurológicos e alterações do tecido nervoso provocadas pela malária grave. A melatonina é um hormônio endógeno com papel bem descrito, envolvido no controle das funções cerebrais e na manutenção da integridade da barreira hematoencefálica. Avaliamos o efeito da melatonina nas alterações histológicas, rompimento da barreira hematoencefálica e deficiências neurocognitivas em camundongos que desenvolveram malária cerebral. Camundongos suíços infectados com *Plasmodium berghei* cepa ANKA foram utilizados como modelo de malária cerebral. O tratamento com melatonina (5 e 10 mg/kg) foi realizado por quatro dias consecutivos após a infecção, e os dados mostraram um aumento na taxa de sobrevivência em camundongos infectados tratados com melatonina. Também foi observado que o tratamento com melatonina impediu a formação do edema cerebral e evitou a quebra da barreira hematoencefálica induzida pela infecção por *Plasmodium berghei*. Além disso, a coloração com hematoxilina e eosina demonstrou que a melatonina atenua as alterações histológicas em animais infectados com *Plasmodium*. A melatonina também foi capaz de prevenir danos motores e cognitivos em camundongos infectados. Esses resultados mostram pela primeira vez que o tratamento com melatonina preveniu danos histológicos cerebrais e alterações neurocognitivas induzidas pela malária cerebral.

Palavras-chave: malária cerebral, melatonina, barreira hematoencefálica, comprometimento neurocomportamental, *Plasmodium*.

ABSTRACT

Cerebral malaria is characterized by permanent cognitive impairments in *Plasmodium*-infected children. Antimalarial therapies show little effectiveness to avoid neurological deficits and nervous tissue alterations elicited by severe malaria. Melatonin is a well-recognized endogenous hormone involved in the control of brain functions and maintenance of blood–brain barrier integrity. The current study has evaluated the effect of melatonin on the histological alterations, blood–brain barrier leakage, and neurocognitive impairments in mice developing cerebral malaria. Swiss mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA strain was used as cerebral malaria model. Melatonin treatment (5 and 10 mg/kg) was performed for four consecutive days after the infection, and data have shown an increased survival rate in infected mice treated with melatonin. It was also observed that melatonin treatment blocked brain edema and prevented the breakdown of blood–brain barrier induced by the *Plasmodium* infection. Furthermore, hematoxylin and eosin staining revealed that melatonin mitigates the histological alterations in *Plasmodium*-infected animals. Melatonin was also able to prevent motor and cognitive impairments in infected mice. Taken together, these results show for the first time that melatonin treatment prevents histological brain damages and neurocognitive alterations induced by cerebral malaria

Keywords: cerebral malaria, melatonin, blood–brain barrier, neurobehavioral impairment, Plasmodium

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa geográfico da taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) por país, 2018. Fonte: Malaria Report - WHO database, 2019.....17
- Figura 2:** Desenho esquemático do ciclo evolutivo do *Plasmodium falciparum* em seu hospedeiro vertebrado (homem), evidenciando os estágios evolutivos do parasita na fase eritrocítica. Fonte: Adaptado de SCHMIDT et al., 2015.....18
- Figura 3:** Mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, levando a obstrução do fluxo sanguíneo no quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de JAIN et al., 2013.....23
- Figura 4:** Fórmula estrutural da N-acetil-5-metoxitriptamina (Melatonina). Fonte: JIMENEZ-JORGE et al., 2007.....28
- Figura 5:** Linha temporal dos dias de tratamento, inoculação da cepa PbA e experimentos realizados. Dpi = dia pós-infecção; RMCBS = Rapid Murine Coma and Behavior Scale.....33
- Figura 6:** A melatonina prolongou a sobrevivência de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*. Camundongos infectados com PbA foram tratados com melatonina a 5 e 10 mg/kg por 4 dias consecutivos. **(A)** Curva de sobrevivência de camundongos albino suíços infectados. A curva de sobrevivência melhorou após o tratamento com melatonina em comparação ao grupo PbA ($p \leq 0,05$, teste de Log-Rank). **(B)** Evolução da parasitemia em relação aos dias após a infecção dos camundongos Albino Suíço infectados com PbA. A curva de parasitemia não diferiu significativamente entre os grupos (ns, não significativo). **(C)** Variação do peso corporal durante a infecção (%). Determinação da massa corpórea durante os dias pós-infecção (%). Não houve variação da massa corpórea significativamente durante a análise (ns, não significativo); (n= 8 animais / grupo). Os dados são apresentados como média \pm DP.....41
- Figura 7:** Avaliação dos sinais neurológicos a partir da utilização do protocolo RMCBS. Todos os indicadores foram significativamente reduzidos em camundongos infectados com PbA 6 dias após a infecção. O tratamento com melatonina melhorou todos os domínios analisados: **(A)** Coordenação, **(B)** Desempenho motor, **(C)** Força e

tônus muscular, **(D)** Reflexos e autopreservação, **(E)** Comportamento relacionado à higiene. A soma dos escores de todos os parâmetros foi registrada como uma pontuação total para cada grupo (n= 10 animais / grupo). Os dados são apresentados como média \pm DP. *p<0,01 vs. controle; #p<0,01 vs. PbA; ##p<0,05 vs. PbA.....42

Figura 8: Avaliação do ensaio de permeabilidade vascular. A melatonina mantém a integridade da barreira hematoencefálica na ECM. **(A)** Análise qualitativa do extravasamento vascular de camundongos controle, infectados com a cepa PbA, camundongos infectados tratados com melatonina 5mg/kg e melatonina 10mg/kg. Barras de escala: 0,5 mm. **(B)** Quantificação do extravasamento Azul de Evans para o cérebro no 6º d.p.i. (n = 8 animais / grupo). O experimento foi repetido três vezes e submetido a ANOVA de uma via. Dados expressos em média \pm DP. * p <0,01 vs. controle; # p <0,01 vs. PbA.....44

Figura 9: O tratamento com melatonina reduziu o edema cerebral na MCE. Avaliação do conteúdo de água no cérebro de camundongos foi realizada no 6º dia pós-infecção nos diferentes grupos. (n= 7 animais / grupo). Os dados são apresentados como média \pm DP. *p<0,01 vs. controle; #p<0,01 vs. PbA; ##p<0,05 vs. PbA.....45

Figura 10: Tratamento com melatonina diminui alterações histopatológicas no cérebro de camundongos infectados com PbA. Microfotografias representativas do córtex cerebral de camundongos no 6º d.p.i. coradas com H&E. **(A)** Córtex cerebral de camundongos não infectados (Controle) com aparência histológica normal; Camundongos infectados com a cepa PbA mostrando presença de infiltrados celulares (setas) e vacuolização (asterisco); grupos tratados com melatonina nas doses de 5 e 10mg/kg apresentando redução das alterações; lente objetiva 20X. **(B)** Córtex cerebral de camundongos do grupo PbA apresentando áreas de infiltrados (setas. Lente objetiva 60X), vasos dilatados (DV. Lente objetiva 40X) e vasos ocluídos (OV. Lente objetiva 60X). **(C)** Quantificação do número de vasos dilatados, vasos ocluídos e focos hemorrágicos. (n= 10 animais / grupo. Dados expressos em média \pm DP. * p<0,01 vs. controle; ** p<0,05 vs. controle; # p <0,01 vs. PbA; ## p<0,05 vs. PbA. (barras, 50 μ m).....47

Figura 11: Análise do número total de células por área em cortes do cérebro usando coloração DAPI (lente objetiva 20X). **(A)** Os campos mais representativos da área cortical do cérebro são mostrados (barra de escala, 50 μ m). **(B)** Quantificação da coloração nuclear por DAPI em diferentes grupos utilizando o software ImageJ. Dados expressos em média \pm DP de três; n = 7 animais / grupo. * p<0,01 vs. controle; # p<0,01 vs. PbA.....48

Figura 12: Efeito protetor da melatonina frente ao comprometimento motor em camundongos infectados com a cepa PbA 6 dias após a infecção. **(A)** Número de quadrantes cruzados, **(B)** frequência de *grooming* e **(C)** frequência de *lifting*, foram registrados e quantificados. (n= 8 animais / grupo). Dados expressos como média \pm DP. * p <0,01 vs. controle; ** p <0,05 vs. controle; # p <0,01 vs. PbA; ## p <0,05 vs. PbA.....50

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais de acordo com o tratamento.....	33
Quadro 2: Classificação das categorias funcionais e parâmetros avaliados no protocolo RMCBS. Fonte: Adaptado de CARROLL et al., 2010.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS

ANKA – ANtwepen-KAsapa

ANOVA – Análise de variância

BHE – Barreira Hematoencefálica

CEUA – Comissão de ética do uso de animais

d.p.i. – Dias pós-infecção

EDTA – Ácido Diaminotetracético

EO – Estresse Oxidativo

ERO's - Espécies Reativas de Oxigênio

i.p. – Intraperitoneal

ICAM – Moléculas de Adesão Intercelular

IL -10 – Interleucina 10

IL-1 β – Interleucina 1 beta

IL-6 – Interleucina 6

Kg - Quilograma

LNE – Laboratório de Neurofarmacologia Experimental

MC – Malária Cerebral

MCE - Malária Cerebral Experimental

MEC - Matriz Extracelular 18

mg – Miligrama

ml – Mililitro

MS – Ministério da Saúde

NF-kB – Fator Nuclear kappa B

OH⁻ - Radicais hidroxila

OMS – Organização Mundial da Saúde

Pb – Plasmodium berghei

PbA – Cepa ANKA de Plasmodium berghei

PBS – Phosphate Buffered Saline

PfEMP1 – Proteína de membrana do eritrócito 1 de Plasmodium falciparum

PIACM - Plano de Intensificação das Ações de Controle da Malária

pRBCs – Eritrócitos Parasitados

SNC – Sistema Nervoso Central

TAG – Triacilglicerol

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral

UFPA - Universidade Federal do Pará

VCAM – Moléculas de Adesão Vascular

WHO - World Health Organization

μ l - Microlitro

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	18
1.2. TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO	20
1.3. PATOGÊNESE DA MALÁRIA CEREBRAL.....	22
1.4. ALTERAÇÕES NEUROCOGNITIVAS DURANTE O QUADRO DE MALÁRIA CEREBRAL.....	25
1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE MALÁRIA CEREBRAL (MCE).....	27
1.6. MELATONINA.....	28
2. OBJETIVOS.....	31
2.1. OBJETIVO GERAL.....	31
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	32
3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS	32
3.2. INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS ALBINO SUIÇO COM A CEPA PbA.....	32
3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM MELATONINA.....	33
3.4. CARACTERIZAÇÃO DE MALÁRIA CEREBRAL NOS ANIMAIS INFECTADOS.....	35
3.4.1. Curva de sobrevivência, parasitemia, avaliação da massa corpórea.....	35
3.4.2. Avaliação do comprometimento cerebral utilizando o Rapid Murine Coma and behavior Scale (RMCBS).....	35
3.5. ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR.....	37
3.6. EDEMA CEREBRAL.....	37
3.7. ANÁLISES HISTOLÓGICAS.....	38
3.7.1. Cortes histológicos.....	38
3.7.2. Coloração com Hematoxilina e Eosina.....	38
3.7.3. Contagem de células.....	39
3.8. CAMPO ABERTO.....	39
3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1. O TRATAMENTO COM MELATONINA MELHORA A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA E ATENUA A GRAVIDADE DA MCE NIMAIS EXPERIMENTAIS	40
4.2. MELATONINA PROTEGE CONTRA A QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E FORMAÇÃO DE EDEMA CAUSADA PELA INFECÇÃO COM PbA.....	44
4.3. MELATONINA ATENUA ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM ANIMAIS INFECTADOS COM A CEPA PbA.....	47
4.4. TRATAMENTO COM MELATONINA ATENUA ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS MOTORAS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO COM PbA	50
5. DISCUSSÃO.....	52
6. CONCLUSÃO.....	58
7. REFERÊNCIAS	59
ANEXO I	70

1. INTRODUÇÃO

1.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A malária é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Plasmodium* spp., transmitida de forma indireta através da picada do mosquito fêmea do gênero Anopholes. Atualmente, seis espécies são conhecidas por apresentarem a característica de induzir a infecção em humanos, sendo elas *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* e *P. simium*, sendo as duas últimas caracterizadas pela transmissão zoonótica da doença. (ALVARENGA et al., 2019). No Brasil, as espécies predominantes são a *P. vivax* e *P. Falciparum*, sendo essa última a responsável por induzir as complicações mais severas decorrentes da infecção (QUEIROZ et al., 2008; WHO, 2020).

Segundo dados do Relatório Mundial da Malária, publicado em 30 de novembro de 2020 pela Organização Mundial de Saúde, 229 milhões de casos foram notificados em todo o mundo no ano de 2019. Destes, evoluíram a óbito aproximadamente 409 mil casos, sendo crianças menores de cinco anos o grupo vulnerável mais afetado pela doença, representando 67% (274.000) do número total de mortes (WHO, 2020) como demonstrado na figura 1.

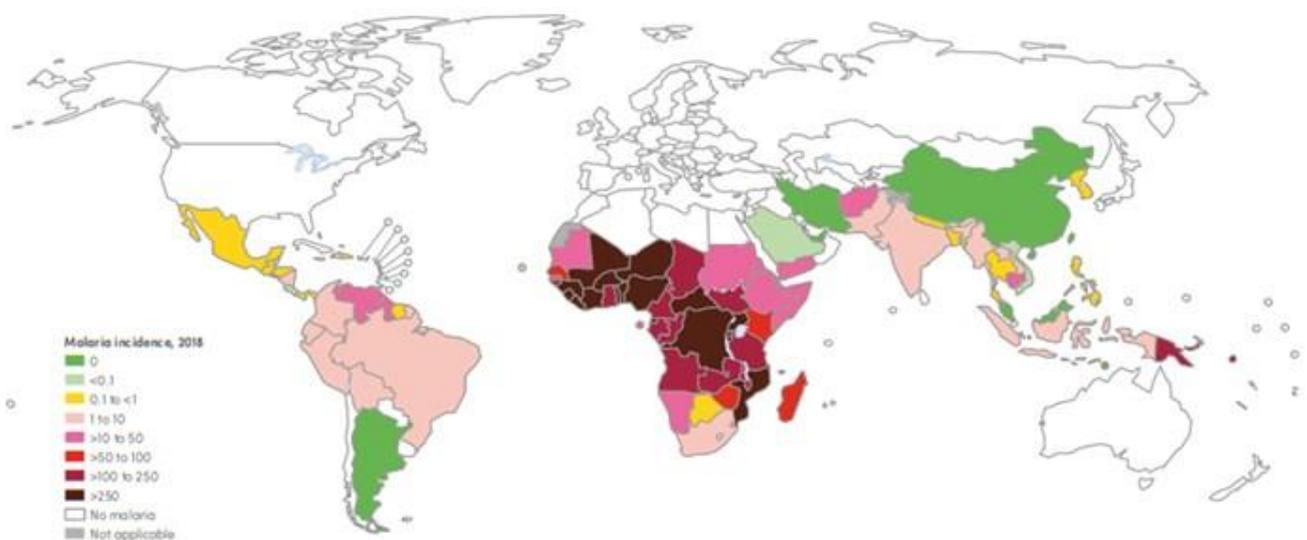


Figura 1: Mapa geográfico com a taxa de incidência de casos de malária (casos por 1.000 habitantes em risco) por país, 2018. Fonte: Malaria Report - WHO database, 2019.

A malária ainda é considerada um problema de saúde pública em diversos países, acometendo principalmente a África Tropical, Sudeste Asiático e América Latina, devido características ambientais que favorecem a progressão da infecção como alta umidade, chuvas frequentes e temperatura ideal que permitem a reprodução do agente vetor e, conseqüentemente, o aumento do número de casos (MILLER et al., 2002; WALTHER & WALTHER, 2007).

Ainda que se fale de erradicação da doença, a incidência de novos casos demonstra que ainda é uma realidade distante. O total do financiamento para o controle e eliminação da malária alcançou estimados US\$ 3 bilhões em 2020. As contribuições dos governos de países endêmicos totalizaram US\$ 900 milhões, representando 31% do financiamento total. Embora sejam destinadas verbas consideráveis e que existam planos de ação para controle de doença, o número de casos notificados cresceu cerca de 10 milhões de 2017 para 2019 (WHO,2020).

No Brasil, a maioria dos casos ocorreram na região amazônica, onde a doença é considerada endêmica, com predominância nos estados do Amazonas, Acre e Pará. Dos casos notificados, quase 90% são episódios não complicados da doença, causados pela infecção por *Plasmodium vivax*, os outros 10% são causados por *Plasmodium falciparum*, espécie responsável pelo desenvolvimento da forma mais grave da doença (MARTINS et al., 2009).

Dados do Programa Nacional de Controle de Malária (PNCM) mostram que no Brasil, durante o ano de 2019 o registro de casos notificados de malária chegou a 157.454. O estado do Pará ocupou o segundo lugar no número de infecções com 20,69% desse total, ficando atrás somente do estado do Amazonas, responsável por 40,6% dos casos. Do total de casos, 17.139 foram causadas por *P. falciparum* em todo território nacional, enquanto que no ano 2017 foram contabilizados 15.300 casos, um aumento de 12,02% entre os anos. Em relação ao primeiro semestre de 2020, foram registrados 60.713 casos de malária, sendo 8.758 casos de infecção por *P. falciparum*, um aumento de 14,4% se comparado com o mesmo período do ano de 2019, quando foram registrados 7.656 casos. Essa espécie de *Plasmodium* induz a malária cerebral, principal complicação da malária grave, uma infecção com letalidade que pode chegar a 50%, considerando que quando não tratada dentro de um curto intervalo de tempo pode levar o paciente a óbito. (GOMES et al., 2011; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2020).

No que diz respeito ao tratamento da infecção, o Ministério da Saúde preconiza um esquema de combinação de fármacos antimaláricos que atuam em diferentes estágios do ciclo evolutivo do parasita para o tratamento da malária sistêmica. Entre os esquemas adotados estão: Artemeter+Lumefantrina e Artesunato+Mefloquina administrados por via oral (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Para o tratamento da malária cerebral, desencadeada por infecções por *Plasmodium falciparum*, o Artesunato é o medicamento de primeira escolha para o tratamento da infecção tanto em adultos quanto em crianças, com administração intravenosa por 6 dias conforme a orientação da Organização Mundial da Saúde (VARO et al., 2018). No entanto, apesar da eficácia do tratamento com Artesunato ser comprovada, por atuar somente como um antimalárico, o uso desse medicamento continua insuficiente para evitar os danos centrais e a alta taxa de mortalidade associada a malária cerebral (VARO et al., 2018).

1.2. TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

O *Plasmodium* possui o ciclo evolutivo complexo e dividido em duas fases correspondentes aos seus hospedeiros, intermediário e definitivo. No hospedeiro intermediário encontramos a forma sexuada, enquanto no hospedeiro definitivo encontramos a forma assexuada (TUTEJA, 2007; WHITE et al., 2014).

O ciclo se inicia com a inoculação de esporozoítas sob a pele do hospedeiro vertebrado através da picada do mosquito infectado. Uma vez na corrente sanguínea, inicia-se a fase assexuada que consiste em duas etapas: pré-eritrocítica e eritrocítica (BOYSEN et al., 2013). Os esporozoítas migram para os hepatócitos infectando-os e proliferando por até 10 dias, dando início à fase pré-eritrocítica e assintomática da doença. Uma vez no fígado eles se desenvolvem e evoluem para o estágio de merozoíto (MOTA et al., 2001).

Cada hepatócito infectado tem a capacidade de liberar até 30.000 merozoítos na corrente sanguínea, que irão invadir os eritrócitos iniciando então a fase eritrocítica do ciclo. Dentro dos eritrócitos, o parasita passa por 3 estágios evolutivos: anel (trofozoíto jovem), trofozoíto e esquizonte. O trofozoíto é formado pelo aumento da atividade metabólica e pelo consumo do ferro do grupamento heme da hemoglobina;

enquanto o esquizonte será formado após vários ciclos de divisão celular, podendo liberar aproximadamente 20 novos merozoítos na corrente sanguínea que darão continuidade no ciclo ao infectar novas hemácias, como demonstrado na figura 2 (HALDAR et al., 2007).

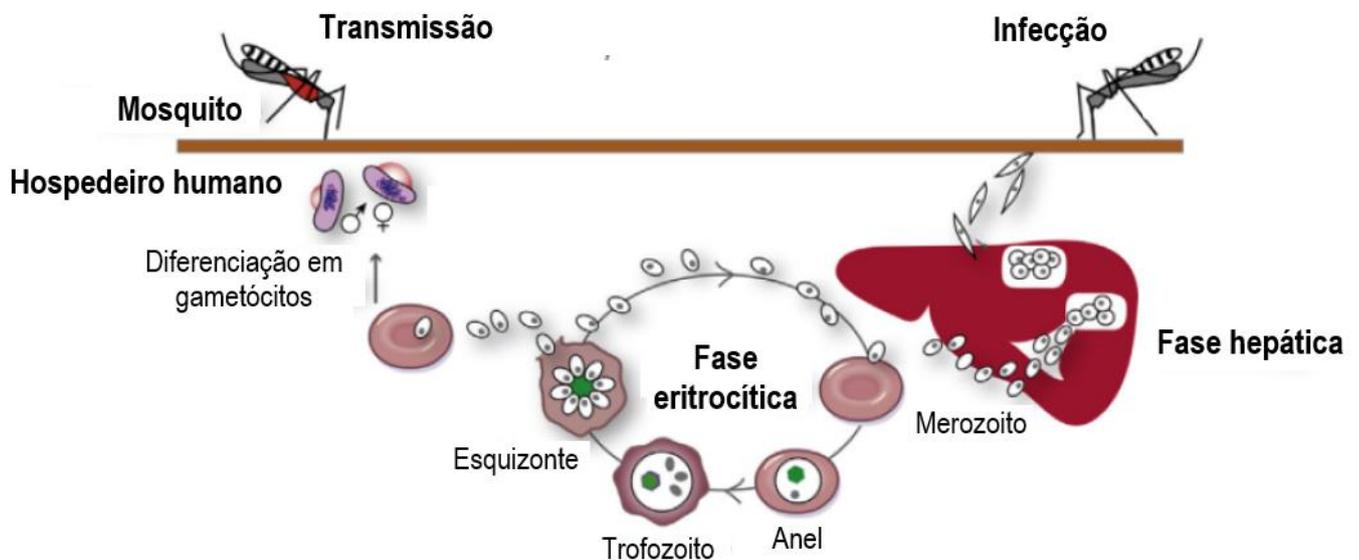


Figura 2: Desenho esquemático do ciclo evolutivo do *Plasmodium falciparum* em seu hospedeiro vertebrado (homem), evidenciando os estágios evolutivos do parasita na fase eritrocítica. Fonte: Adaptado de SCHMIDT et al., 2015.

Após uma série de ciclos eritrocíticos, alguns desses merozoítos, por mecanismos ainda não elucidados, não invadem eritrócitos e passam por outro estágio evolutivo se diferenciando em gametócitos (forma sexuada – machos e fêmeas), infectante ao agente transmissor. No momento do repasto sanguíneo, os gametócitos machos e fêmeas são ingeridos pelo mosquito, sofrem maturação na parede do intestino e se fundem formando o zigoto. Este se transforma em oocineto e em seguida em oocisto, por meio da esporogonia. O oocisto se rompe originando esporozoítos, que são liberados na hemolinfa e migram para as glândulas salivares dos insetos, permitindo que estes sejam repassados ao homem no ato da hematofagia, reiniciando o ciclo (GARCIA, 2010; SADANAND, 2010).

No que diz respeito às manifestações clínicas, os primeiros sinais da doença não são patognomônicos, são iniciados pela ruptura sincronizada das hemácias que permite a liberação dos antígenos maláricos na corrente sanguínea, levando a intensa ativação da resposta imunológica do hospedeiro. Dentre as manifestações clínicas destacam-se: episódios febris, mal estar, cefaléia, dores abdominais, náuseas e vômitos (DE SOUZA & RILEY, 2002).

Quando o indivíduo é infectado com a espécie *Plasmodium falciparum*, o quadro desenvolvido é considerado mais grave, uma vez que a espécie é capaz de induzir, dentre outras complicações da malária grave, a malária cerebral (MC), gerando episódios de convulsões e coma. Esta complicação da doença é destacada devido à sua gravidade e a maior probabilidade de levar o indivíduo infectado à morte (QUEIROZ et al., 2008).

1.3. PATOGÊNESE DA MALÁRIA CERERBAL

A malária cerebral (MC) é uma complicação neurovascular designada como forma mais grave da doença resultante da infecção por *Plasmodium falciparum*. Manifesta-se principalmente por alterações do nível de consciência (incluindo estado de coma), episódios de crises epilépticas, alterações cognitivas e comportamentais que resultam em altas taxas de mortalidade (QUEIROZ et al., 2008; MIRANDA et al., 2010; BERNABEU et al., 2021).

O quadro da MC apresenta patogênese complexa e de caráter multifatorial, sendo definido como um estado de coma associado a disfunções neurológicas provenientes de eventos hemorrágicos (OLIVEIRA et al, 2017). A heterogeneidade da doença pode ser compreendida com base em duas principais teorias, que em conjunto, explicam como as alterações celulares induzem os danos no sistema nervoso central: teoria da obstrução mecânica, proposta no ano de 1894 por Marchiafava & Bignami, e a teoria da inflamação, proposta por Maegraith no ano de 1948 (ADAMS et al., 2002; HUNT & GRAU, 2003; SCHIESS et al., 2020).

A teoria da inflamação consiste na resposta inflamatória exacerbada sendo iniciada pela liberação de antígenos do protozoário *P. falciparum* associada à ativação de macrófagos. Os macrófagos, por sua vez, secretarão mediadores pró-

inflamatórios, como Interleucinas, Fator de Necrose Tumoral (TNF) e Quimiocinas, que estimularão a produção de citocinas pró-inflamatórias, dentre elas destaca-se TNF- α (GOMES et al., 2011).

A excessiva produção de TNF- α induz a síntese de outras citocinas pró-inflamatórias, gerando o recrutamento dos linfócitos CD4 e CD8, bem como o aumento da expressão de moléculas de adesão do endotélio, tais como a molécula de adesão intercelular 1 (I-CAM 1) e a molécula de adesão vesicular 1 (V-CAM 1). A expressão dos receptores endoteliais impulsiona o sequestro das células para os capilares do tecido nervoso, gerando o desenvolvimento de coagulopatias, disfunção das células endoteliais e acúmulo de leucócitos na microcirculação do tecido nervoso (ARMAH et al., 2005; MIRANDA et al., 2010).

O sequestro dos eritrócitos parasitados contendo formas maduras do parasita para a microvasculatura do tecido nervoso é a base da teoria da obstrução mecânica, em que sugere que a MC é uma consequência do processo de formação de rosetas levando à obstrução do fluxo sanguíneo e ao quadro de hipóxia (Figura 3).

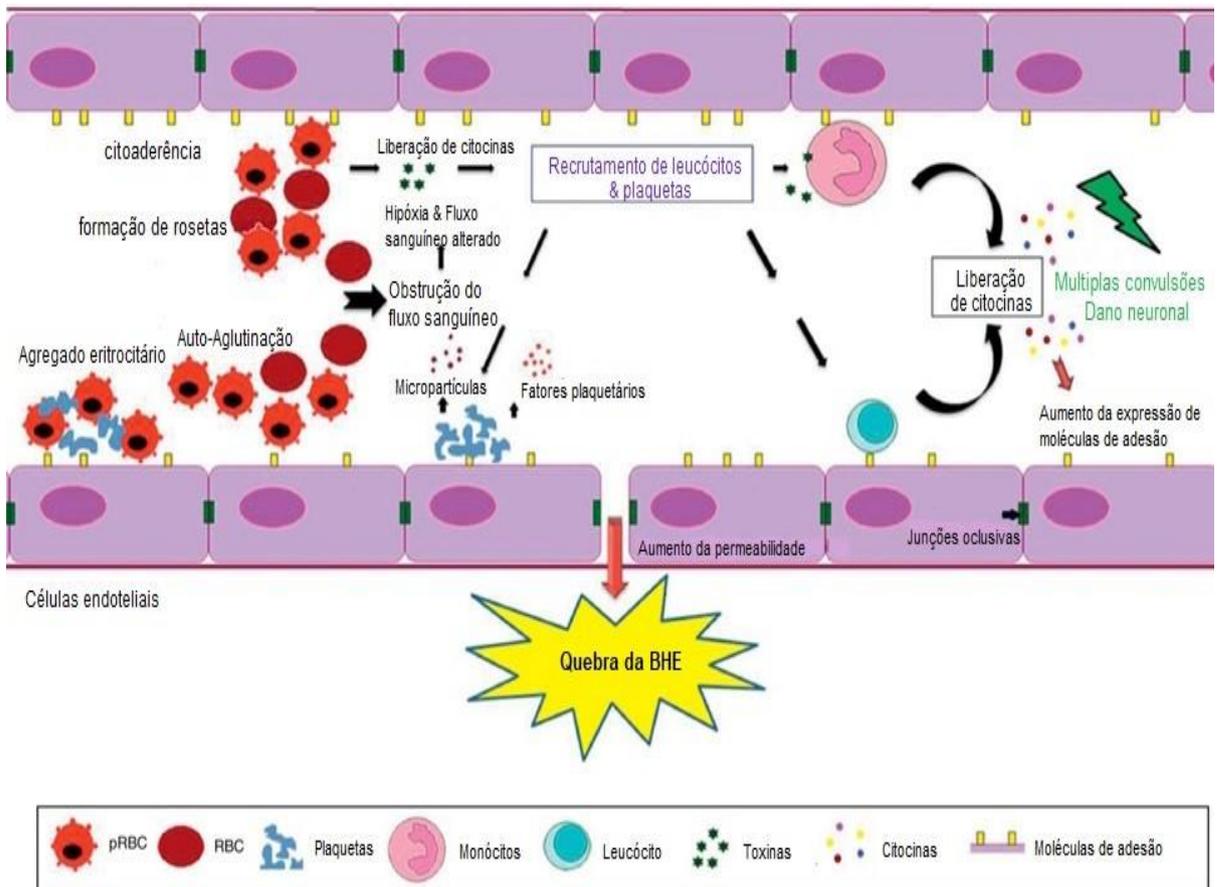


Figura 3: Mecanismo de citoaderência de eritrócitos parasitados na microvasculatura cerebral, levando a obstrução do fluxo sanguíneo no quadro de malária cerebral. Fonte: Adaptado de JAIN et al., 2013.

O sequestro das células parasitadas é mediado pela expressão de proteínas do parasita na superfície das hemácias, como a PfEMP-1 (proteína de membrana 1 do eritrócito de *Plasmodium falciparum*), que possui a capacidade variar antígenicamente em um curto intervalo de tempo, permitindo que os parasitas escapem da resposta imune do hospedeiro (HORA et al., 2016). Esta proteína possui propriedades adesivas e é a principal responsável pela citoaderência às células endoteliais. Essa ligação levará à obstrução vascular, causando processos isquêmicos e micro hemorragias localizadas ao longo do cérebro, gerando posteriormente o estado de coma. Esse conjunto de fatores induzirá a quebra da Barreira Hematoencefálica (BHE) (NISHANTH & SCHLÜTER, 2019).

A BHE é uma barreira física, com permeabilidade altamente seletiva integrada à unidade neurovascular formada por células endoteliais, ocludinas, pericitos, matriz extracelular e astrócitos que ficam agrupadas nos vasos sanguíneos do tecido nervoso, o que lhe atribui a capacidade de limitar e regular a troca de substâncias entre sangue e o SNC. Durante o quadro de MC, as alterações na estrutura da barreira levam à perda da homeostase, ao comprometimento da sinalização neuronal e morte celular por apoptose, condição essa considerada como elemento-chave na progressão da infecção (HORA et al., 2016; SWEENEY et al., 2019).

1.4. ALTERAÇÕES NEUROCOGNITIVAS DURANTE O QUADRO DE MALÁRIA CEREBRAL

A principal característica da malária cerebral é a presença de danos neurológicos causados pelo comprometimento vascular e danos celulares provocados pela presença de mediadores inflamatórios no parênquima cerebral (CLARK & ALLEVA, 2009). As manifestações clínicas mais recorrentes são as alterações dos níveis de consciência, sendo o coma o quadro mais grave, e a presença de convulsões frequentes (IDRO et al., 2010). Distúrbios motores também são observados, destacando-se ataxia cerebelar, hemiplegias e mioclonias, bem como distúrbios respiratórios causados por danos no tronco encefálico (HENRIQUES, 1972).

A Organização Mundial da Saúde define como primeiro critério diagnóstico para a malária cerebral o estado de coma até 1h após o término de uma convulsão, associada à parasitemia positiva para *P. falciparum*. Em crianças, durante a fase

aguda da infecção, a perda de consciência associada a crises convulsivas é comumente observada, podendo evoluir a óbito entre 6-12h após o aparecimento dos primeiros sinais neurológicos, quando não tratados de forma adequada (WHO, 2010; GAY et al., 2012). Aproximadamente 18% dos pacientes que sobrevivem, apresentam sequelas transitórias que incluem cegueira cortical, ataxia, hemiparesia e distúrbios de memória que duram entre 4-8 semanas após desaparecimento da parasitemia (MISHRA et al., 2012).

Jhon et al., demonstraram que 26% de crianças que tiveram a doença e receberam tratamento adequado apresentaram, 6 meses depois, prejuízos locomotores e neurocognitivos (JHON et al., 2008). Esses danos tardios são classificados como “Síndrome Neurológica Pós-Malária” (SNPM) e incluem alterações como paralisia de membros, reflexos periféricos prejudicados, convulsões, perda sensorial e, o mais comum, ataxia cerebelar com perda de equilíbrio e variações dos movimentos voluntários, como resposta à lesão axonal gerada pela neuroinflamação exarcebada local e pelo estresse oxidativo (REIS et al., 2012; CASTALDO et al., 2020; SCHIESS et al., 2020).

Estratégias de intervenção podem ser utilizadas favoravelmente visando amenizar as alterações neurológicas desencadeadas pela infecção (REIS et al., 2010). Por isso, a busca por terapias alternativas utilizando agentes com propriedades anti-inflamatória, antioxidante e de neuroproteção tornam-se cada vez mais viáveis.

Uma variedade de terapias que têm como alvo diferentes vias metabólicas do organismo do hospedeiro são testadas em modelos experimentais de MC (MCE) (RIGGLE et al., 2020). A utilização da Ripamicina, uma inibidora da mTOR (que desempenha um papel central na regulação da resposta inflamatória), apresentou resultados promissores ao amenizar os danos neurológicos desencadeados pela MCE (GORDON et al., 2015). O uso da N-acetilcisteína, um antioxidante clássico, reduziu os danos cognitivos tardios desencadeados pela infecção (BARICHELLO et al., 2007). Iribhogbe et al., (2013) demonstraram que o tratamento com Vitamina A também apresentou resultados promissores ao prevenir sequelas de longo prazo em uma infecção por *Plasmodium berghei* ANKA. Embora os estudos tenham apresentado resultados favoráveis, a busca de substâncias que consigam agrupar o maior número de características com potencial terapêutico se destaca cada vez mais na literatura.

Uma estratégia que visa amenizar os danos neurológicos e diminuir a taxa de mortalidade em uma infecção por MC.

1.5. MODELO EXPERIMENTAL DE MALÁRIA CEREBRAL (MCE)

A infecção induzida pela cepa *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) descoberta por Vincke e Lips (1948) é um modelo bem caracterizado de malária cerebral experimental. Camundongos susceptíveis à infecção, linhagem CBA/J, C57BL/6 e Albino suíço, são utilizados para elucidar os mecanismos associados ao desenvolvimento da doença, uma vez que apresentam sinais clínicos similares aos decorrentes da infecção por *Plasmodium falciparum* no homem (HUNT et al., 2010).

Ataxia, paralisia, convulsão, alterações respiratórias são características dessa síndrome fatal que podem ser observadas no modelo murino da doença. As manifestações clínicas começam a aparecer entre o 6° e o 12° dia pós-infecção, levando o animal a óbito horas após o aparecimento dos primeiros sinais, com uma taxa de mortalidade que varia entre 70% e 100%. Animais resistentes à infecção apresentam uma resposta diferencial ao parasita e evoluem a óbito por meio de uma hiperparasitemia e anemia grave (ENGWERDA et al., 2005; MARTINS et al., 2009a; GHAZANFARI et al; 2018).

Estudos *post-mortem* em encéfalo de roedores acometidos pela manifestação demonstraram o aumento da expressão de TNF- α (Brown et al., 1999). Esta citocina é descrita por gerar um quadro de neuroinflamação e induzir em humanos e roedores a ativação do endotélio vascular (EV) e o aumento da expressão de receptores endoteliais que implicam diretamente no sequestro de diferentes células para microvasculatura encefálica e outros órgãos. Embora animais infectados com a cepa PbA não apresentem o sequestro de eritrócitos parasitados como característica histopatológica predominante, a ativação do EV induz o recrutamento de células TCD8+ para o sistema nervoso entre o 3° e o 5° dia pós-infecção. Esse evento leva à disfunção vascular, hipóxia, formação de edema e a consequente quebra da barreira hematoencefálica em diferentes áreas no encéfalo, como tronco encefálico e cerebelo (GOMES et al., 2011; HOWLAND et al., 2015; PAIS & PENHA-GONÇALVES, 2019).

Assim como em humanos, o rompimento da BHE na MCE gera micro hemorragias e uma neuroinflamação de forma exacerbada, consequência da presença de mediadores inflamatórios no parênquima encefálico. Estes eventos induzem alterações neurocognitivas nos animais infectados, tais como ataxia, hemiparaplegia e convulsões (DE SOUSA et al., 2018). Desruisseaux et al., (2008) demonstraram que durante a fase aguda de infecção apresentaram comprometimento cognitivo e motor, por meio de testes realizados no 7º dia pós-infecção. Estudos também demonstraram que a infecção com a cepa PbA foi capaz de induzir danos comportamentais e cognitivos tardios, mesmo após a ausência de parasitas circulantes. (MIRANDA et al., 2010; REIS et al., 2012). Esses achados da utilização de modelos experimentais como ferramenta importante para estudar os mecanismos inerentes à patogênese da malária cerebral, as alterações neurocognitivas decorrentes do quadro e a busca de novas moléculas com características pleiotrópicas visando minimizar os danos associado à infecção, como é o caso da melatonina.

1.6. MELATONINA

A melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) é um hormônio sintetizado e secretado, predominantemente, pela glândula pineal durante a fase escura do ciclo claro-escuro. Além da glândula pineal, a melatonina pode ser liberada em vários locais no sistema nervoso central em regiões mais propensas a sofrerem ações de radicais livres, incluindo a medula, o cerebelo, a retina e o córtex cerebral, o que sustenta seus diversos papéis fisiológicos (JIMENEZ-JORGE et al., 2007; RADOGNA et al., 2010).

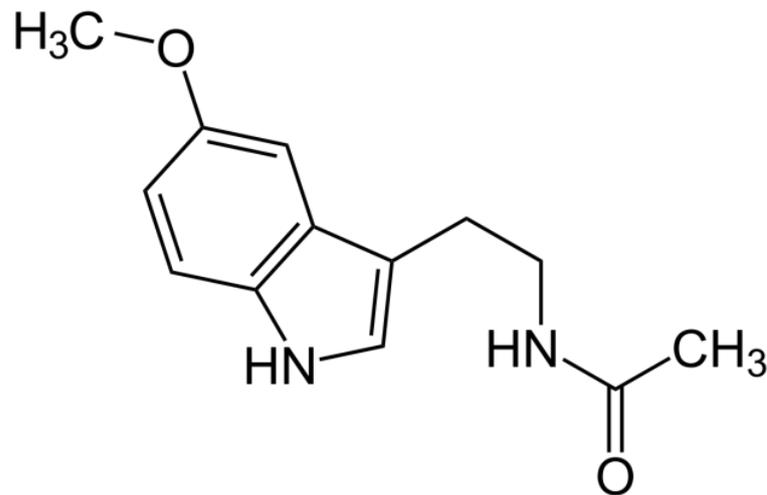


Figura 4: Fórmula estrutural da N-acetil-5-metoxitriptamina (Melatonina). Fonte: JIMENEZ-JORGE et al., 2007.

Estudos anteriores descrevem que a melatonina como uma molécula de característica pleiotrópica, apresentando multifuncionalidade frente à patologias diversas (RADOGNA et al., 2010; FU et al., 2020). Em modelos experimentais que induzem a quebra da barreira hematoencefálica, como traumatismo cranio-encefálico e isquemia, a molécula reduziu lesões secundárias (formação de edema e morte celular por apoptose), bem como déficits funcionais (danos cognitivos e motores). Além de apresentar ação neuroprotetora em modelos de lesões cerebrais agudas, nota-se também a eficácia da melatonina em condições neurodegenerativas crônicas, como Alzheimer e Huntington, mostrando eficácia na manutenção da integridade da BHE (SAMANTARAY et al., 2008; WANG et al., 2011; RUDNITSKAYA et al., 2015).

A melatonina também é descrita como um potente agente anti-inflamatório, regulando a expressão de citocinas e demais fatores envolvidos na cascata da inflamação. Estudos apontam que a molécula promove a diminuição da ativação do fator NF- κ B, bem como dos níveis de mRNA de TNF- α em modelos de neuroinflamação induzida por D-Galactose (ALI et al., 2015). Possui a capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-1 β e TNF- α , bem como a capacidade de aumentar concomitantemente a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10, prevenindo possíveis lesões teciduais causadas por uma resposta inflamatória exacerbada (CUESTA et al., 2011; CARRILLO-VICO et al., 2013).

Estudos anteriores demonstraram a melatonina como um potente agente antioxidante direto e indireto em modelos de desordens associadas alterações do equilíbrio do estado redox do organismo (LUO et al., 2020). A molécula possui a capacidade de eliminar uma variedade de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, incluindo radical hidroxila, peróxido de hidrogênio e ânion superóxido (REITER et al., 2001). Ao contrário dos antioxidantes clássicos, a melatonina é desprovida de atividade pró-oxidativa e todos os intermediários conhecidos gerados pela interação do hormônio com espécies reativas são também sequestradores de radicais livres. Este fenômeno é definido como a reação em cascata de eliminação de radicais livres da família da melatonina. Devido essa característica, uma molécula de melatonina tem o potencial de eliminar até 4 ou mais espécies reativas, caracterizando a molécula como um potente agente antioxidante. Na forma indireta, essa indolamina possui a capacidade de regular a ação da atividade de várias enzimas antioxidantes como catalase e glutatiónperoxidase, potencializando o desempenho destas (TAN et al., 2003; FISCHER et al., 2013; ZHANG et al., 2014).

Atualmente, a melatonina tem sido implicada em eventos cognitivos como processo de aprendizagem e formação da memória, bem como na melhoria da coordenação motora após lesões cerebrais (HE et al., 2013; BAVITHRA et al., 2017). Além disso, o hormônio atua como um agente de importante função na regulação fisiológica da homeostase celular, característica relevante para suas aplicações terapêuticas (ACUÑA-CASTROVIEJO et al., 2014). Por todas essas características e por possuir a capacidade de se difundir pela barreira hematoencefálica apresentando baixa toxicidade, a melatonina passou a ser utilizada em modelos pré-clínicos de vários distúrbios do SNC (SAMANTARAY et al., 2008; KIM & LEE, 2014; RUDNITSKAYA et al., 2015).

Pouco se sabe sobre o efeito da melatonina no hospedeiro infectado com *Plasmodium*, principalmente no que diz respeito ao comprometimento neurológico desencadeado pela doença. Dentro desse contexto, a utilização do hormônio pode ser considerada uma alternativa farmacológica capaz de modular a progressão da doença, evitando alterações histológicas e deficiências neurocognitivas induzidas pela infecção em modelo murino de malária cerebral experimental.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o efeito neuroprotetor da melatonina frente às alterações induzidas pelo quadro de malária cerebral em modelo murino.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinação da curva de sobrevivência de camundongos da linhagem albino suíço inoculados com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA) e tratados com melatonina nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg.
- Determinar os níveis de parasitemia e alterações na massa corpórea em camundongos infectados com PbA e tratados com melatonina nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg.
- Avaliar o quadro de malária cerebral experimental com base no comprometimento neurológico de camundongos infectados e tratados com melatonina nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg através do protocolo RMCBS.
- Avaliar a integridade da barreira hematoencefálica a partir da determinação do extravasamento vascular e formação do quadro de edema encefálico de camundongos infectados com PbA e tratados com melatonina nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg
- Avaliar a presença de alterações histológicas no cérebro de camundongos infectados com PbA e tratados com melatonina nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg.
- Avaliar o comprometimento motor de camundongos infectados com PbA e tratados com melatonina nas doses de 5 mg/kg e 10 mg/kg.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Albino Suíço (machos e fêmeas), entre 46-54 dias pós-natal, pesando entre 20-25 gramas, obtidos no biotério central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno, em grupos de no máximo 5 camundongos por gaiola, em condições assépticas, com comida controlada e água (NUTIVAL) ad libitum e sob condições de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) e temperatura ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) controladas. Os experimentos foram realizados nas dependências do Laboratório de Neurofarmacologia Experimental (LNE-UFPA) respeitando todas as normas éticas para pesquisa com animais de laboratório, estando este projeto aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animal (CEUA) parecer 6211241117.

3.2. INOCULAÇÃO DOS CAMUNDONGOS ALBINO SUIÇO COM A CEPA PbA

O protocolo de infecção foi seguido conforme descrito anteriormente por Oliveira et al., (2017). Previamente a inoculação do grupo experimental, uma amostra da cepa de *Plasmodium berghei* ANKA (PbA), obtida no Laboratório de Neurofarmacologia Experimental, foi descongelada e inoculada em um camundongo para uma primeira passagem com o intuito de garantir a virulência da cepa. Durante a fase de ascensão da parasitemia, em aproximadamente 10%, o conteúdo sanguíneo do camundongo foi coletado por punção cardíaca e disponibilizado para a infecção dos grupos experimentais.

A coleta por punção cardíaca foi realizada com auxílio de agulha e seringa de insulina contendo heparina (5000U/ml) como agente anticoagulante e solução salina com tampão fosfato (PBS; pH 7,4). Para garantir um grau de inoculação uniforme nos diferentes grupos, os animais foram infectados intraperitonealmente (i.p) com inoculo

padronizado de $\approx 10^6$ eritrócitos parasitados em 100 μ l de PBS. Os animais controles receberam apenas uma injeção de 100 μ l PBS.

Durante o curso da doença, os camundongos foram analisados diariamente para obtenção de parâmetros como perda de peso, parasitemia, sobrevivência e sinais clínicos da MCE, tais como ataxia, desorientação e convulsão.

3.3. GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO COM MELATONINA

A Melatonina foi obtida na empresa Sigma-Aldrich e diluída em Dimetilsulfóxido a 1% - DMSO 1% (Fisher Chemical). Para a realização dos experimentos, os camundongos foram divididos em grupos controle e grupos infectados. Os grupos controle foram divididos em: controle não infectado, grupo DMSO 1%, grupo melatonina 5mg/kg e grupo melatonina 10mg/kg. Os grupos infectados foram divididos em: PbA, PbA + DMSO 1%, PbA + melatonina 5mg/kg e PbA + melatonina 10mg/kg.

O grupo controle não infectado recebeu salina 0,9%, os controles droga receberam Melatonina nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg, os grupos DMSO 1% (infectado e não infectado) receberam DMSO 1%. O grupo PbA recebeu injeções de salina 0,9% e os grupos infectados e tratados com Melatonina receberam as doses de 5 e 10mg/kg após a infecção. Todas as injeções foram feitas durante 4 dias consecutivos, sendo a primeira realizada 1h após a realização da infecção.

A organização dos grupos experimentais conforme o tratamento está presente no quadro 1 e linha temporal experimental está representada na figura 5.

Grupo	Tratamento (grupo)
Controle	Salina (Controle)
	DMSO 1% (DMSO 1%)
	Melatonina 5mg/kg (Melatonina 5mg/kg)
	Melatonina 10mg/kg (Melatonina 10mg/kg)
Infectado	Salina (PbA)
	DMSO 1% (PbA + DMSO 1%)
	Melatonina 5mg/kg (PbA + melatonina 5mg/kg)
	Melatonina 10mg/kg (PbA + melatonina 10mg/kg)

Quadro 1: Organização dos grupos experimentais de acordo com o tratamento.

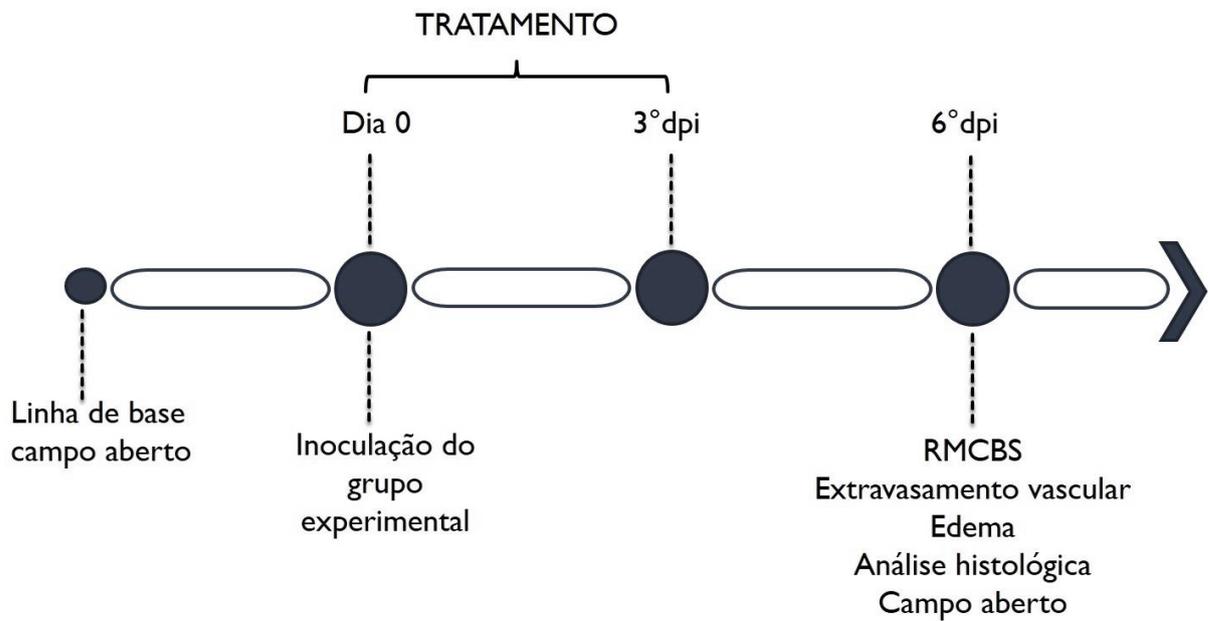


Figura 5: Linha temporal dos dias de tratamento, inoculação da cepa PbA e experimentos realizados. Dpi = dia pós-infecção; RMCBS = Rapid Murine Coma and Behavior Scale.

3.4. CARACTERIZAÇÃO DA MALÁRIA CEREBRAL NOS ANIMAIS INFECTADOS

3.4.1. Curva de Sobrevivência, parasitemia, avaliação da massa corpórea

Para avaliar o quadro de malária cerebral foi realizada a análise clínica dos animais através do acompanhamento da sobrevivência, variação da massa corpórea e evolução da parasitemia, associada ao surgimento dos sinais clínicos (ataxia, paralisia, desorientação e convulsão) entre o 6º e 10º dia após a inoculação da cepa PbA a partir da observação dos animais infectados. A curva de sobrevivência foi obtida com base no monitoramento diário dos animais controles e infectados, considerando o número de animais que evoluíram a óbito por dia. Para a determinação da parasitemia, distensões sanguíneas delgadas foram obtidas da cauda dos camundongos, realizadas em lâminas histológicas. Após secagem, as lâminas foram fixadas em Metanol absoluto (P.A) durante 2 minutos e logo coradas pelo método de Giemsa (10%) por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram observadas em microscópio óptico (NIKON, modelo E200) com óleo de imersão (1000X maximização final). A porcentagem de parasitemia dos animais foi determinada a partir da razão entre a quantidade de eritrócitos parasitados e a quantidade total de células, conforme observado na equação abaixo:

$$\% \text{ parasitemia} = \frac{\text{número de eritrócitos parasitados}}{\text{Número de células totais}} * 100$$

A contagem das células foi realizada com o auxílio do programa ImageJ, garantindo maior precisão na porcentagem de parasitemia de cada animal.

A determinação da parasitemia foi realizada nos dias 3, 5, 7, 9, 12, 15, 17, 19 e 21 pós-infecção, até o último animal evoluir a óbito. Para o monitoramento da massa corpórea, os camundongos foram pesados em balança eletrônica (SF-400) diariamente antes da infecção e nos dias 3, 5, 7, 9 e 12 pós-infecção.

3.4.2. Avaliação do comprometimento neurológico utilizando o protocolo Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS)

No 6º dia pós-infecção (d.p.i.), a caracterização da doença baseada nos sinais clínicos comportamentais foi monitorada usando a escala quantitativa de classificação Rapid Murine Coma and Behavior Scale (RMCBS) adaptado conforme o protocolo descrito por Carroll et al. (2010). Este método foi realizado para avaliar a manifestação clínica precoce da malária cerebral murina. O protocolo consiste em 10 parâmetros que são avaliados e pontuados de 0 a 20, em que 0 corresponde a comprometimento neurológico grave e 20 corresponde à função neurológica preservada.

Os parâmetros avaliados são classificados em 5 categorias funcionais, as quais podem ser observadas no quadro abaixo:

Domínios	Parâmetros avaliados
Coordenação	Marcha
	Equilíbrio
Comportamento exploratório	Desempenho motor
Força e tônus muscular	Posição do corpo
	Força dos membros
Reflexos de auto-preservação	Escape ao toque
	Reflexo auricular (“ <i>pinnareflex</i> ”)
	Reflexo da pata (“ <i>toe pinch</i> ”)
	Agressão
Comportamento relacionado à higiene	Coloração do pelo

Quadro 2: Classificação das categorias funcionais e parâmetros avaliados no protocolo RMCBS. Fonte: Adaptado de CARROLL et al., 2010.

Inicialmente, os animais permaneceram na sala de experimentos durante 20 minutos para ambientação. O primeiro parâmetro analisado foi o de agressão e escape ao toque, onde observamos a capacidade de resposta ao manuseio dentro da gaiola. Em seguida realizamos os primeiros 90 segundos de gravação em que o animal foi colocado no canto superior esquerdo de uma caixa de observação (comprimento: 31,8 cm; largura: 19,8 cm; altura: 10,5 cm) e monitorado com o auxílio do programa DebutVideo Capture Software, versão 1.49. A gravação foi analisada offline para avaliar o padrão de marcha, posição corporal e comportamento exploratório.

Posteriormente, o animal foi posicionado sobre uma grade para avaliação da força dos membros. O parâmetro de higiene foi avaliado através da coloração do pelo do animal, seguido pela análise da presença ou ausência de reflexos: auricular (“*pinnareflex*”) e o reflexo da pata traseira (“*toe pinch*”). Nos 90s finais de teste, foi realizada a análise do equilíbrio do animal.

3.5. ENSAIO DE PERMEABILIDADE VASCULAR

O ensaio de Permeabilidade Vascular foi realizado segundo o método descrito por Kim et al., (2014). O extravasamento do corante azul de Evans foi utilizado para avaliar a quebra da barreira hematoencefálica no cérebro de camundongos infectados com a cepa PbA e tratados com melatonina.

No 6º d.p.i., os camundongos dos grupos controle, infectados e tratados com melatonina foram anestesiados com uma injeção intraperitoneal de solução de Cloridrato de Quetamina (1mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina (1mg/Kg), seguido da injeção intracardíaca de 200µl do corante Azul de Evans a 2% (Sigma-Aldrich). Após o bombeamento do corante, foi realizada a perfusão com 10 ml de solução salina (0,9%) e uma craniotomia foi feita para retirada do encéfalo. Este foi colocado em uma placa de Petri e levado a uma lupa acoplada ao Sistema de Captura de Imagem (NIKON, modelo SMZ1500) para realização do registro fotográfico de presenças do extravasamento vascular na microvasculatura do animal. Após a obtenção das imagens, o encéfalo foi levado à estufa de secagem por 48h, seguido pela adição de 2ml de formamida (Sigma-Aldrich) para extração do corante. A quantificação foi realizada por meio da leitora de microplaca a um comprimento de onda de 620 nm.

3.6. EDEMA ENCEFÁLICO

A quantidade de água no encéfalo dos animais foi definida como marcador para o quadro de edema encefálico, segundo o método descrito por Ding et al., (2015). No 6º d.p.i. os animais foram anestesiados e eutanasiados para a realização da craniotomia. O encéfalo foi retirado e imediatamente pesado em balança analítica para a determinação do peso úmido (PU). Posteriormente, o encéfalo foi encaminhado à

estufa de secagem por 72h a 80°C para realização de nova pesagem e determinação do peso seco (PS). A porcentagem do conteúdo de água foi estimada como $\{[(PU-PS)/PU]*100\}$.

3.7. ANÁLISES HISTOLÓGICAS

3.7.1. Cortes histológicos

Para a avaliação histológica, os animais foram anestesiados e perfundidos com PBS e paraformaldeído 4%. Os cérebros pós-fixados foram dissecados por craniotomia e armazenados em gaze para imersão em parafina. Inicialmente os cérebros foram progressivamente desidratados em soluções de álcool etílico crescente (70%, 80%, 90%, 95% e 100%) durante 40 minutos cada. Em seguida, as amostras foram diafanizadas em xilol (PA) 40 minutos e parafinizadas (58-60°C) por 40 minutos (2x), formando blocos de parafina. Os blocos então foram cortados com auxílio de micrótomo em uma espessura de 5µm, seguido da montagem das lâminas histológicas. A desparafinização foi feita em estufa de secagem a 56°C por 24 horas, seguido pelo processo de diafanização em xilol.

3.7.2. Coloração de Hematoxilina e Eosina

Para avaliar a organização tecidual, foi utilizada a técnica de coloração de hematoxilina e eosina (HE). Para essa coloração as lâminas com os cortes histológicos foram inicialmente diafanizadas em xilol por 30 segundos, seguido pelo processo de hidratação com banhos de álcool em concentração decrescente (100%, 95%, 90%, 80% e 70%) por 30 segundos, seguido pela imersão em água destilada por 2 minutos. Após isso as lâminas foram imersas em hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavadas em água destilada corrente por 5 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas em eosina por 30 segundos e então lavadas novamente em água destilada corrente por mais 5 minutos. Após esse último passo, as lâminas foram montadas em Permount® (Fisher Scientific. New Jersey, USA).

Os cortes foram analisados utilizando microscópio de luz (Nikon, Eclipse E800 Yokohama, Japan) com câmera digital (Nikon, DXM 1200, Japan) acoplada,

fotografados em lentes objetivas 20, 40 e 60x. As imagens foram armazenadas para posterior análise da presença de vasos ocluídos, vasos dilatados e infiltrados celulares.

3.7.3. Contagem de células

Para contagem de células, foi realizada a coloração com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol; Sigma-Aldrich) conforme descrito anteriormente por Chan et al., (2012). Os cortes foram lavados 3x com PBS e incubados com solução DAPI (1: 10.000) a 37 ° C por 2 min para a marcação nuclear. Em seguida, os cortes foram colocados em meio de montagem (Fluoroshield) e visualizados em microscopia de fluorescência (Nikon_EclipseNi) (objetiva 20x) para garantir a contagem de células do parênquima cerebral. Foram realizadas análises de campo total do córtex de animais diferentes de um mesmo grupo. A média foi determinada e área de contagem foi calculada. Os dados foram analisados com o software ImageJ.

3.8. CAMPO ABERTO

O campo aberto é um teste utilizado para avaliar o comportamento locomotor e exploratório de camundongos. O teste foi realizado no 6° d.p.i. de acordo com o protocolo descrito por Desruisseaux et al. (2008). Foi utilizada uma arena circular de 83 cm de diâmetro e 52 cm de altura. Os animais foram colocados no centro do aparato, individualmente, para efetuar a livre exploração durante 5 minutos. O aparelho foi limpo com álcool 70% entre os ensaios e os testes foram realizados nas mesmas condições padrão. Cada sessão foi devidamente gravada com auxílio do programa Debut Video Capture Software versão 1.49 e posteriormente analisada por meio do software X-Plo-Rat 2005. Os dados registrados incluíram o número de quadrantes cruzados, frequência de autolimpeza (“*grooming*”) e frequência de levantamento (“*lifting*”).

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas usando ANOVA de uma via seguida pelo pós-teste de Tukey-Kramer. Os dados de sobrevivência foram comparados e analisados usando o teste de log-rank das curvas de Kaplan-Meier. Os camundongos foram divididos aleatoriamente e todos os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes. As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism considerando o valor significativo de p abaixo de 0,05.

4. RESULTADOS

4.1. O TRATAMENTO COM MELATONINA MELHORA A TAXA DE SOBREVIVÊNCIA E ATENUA A GRAVIDADE DA MCE

Para avaliar o efeito da melatonina na progressão clínica da MCE, camundongos infectados com a cepa PbA foram tratados com 5 e 10 mg/kg/dia de melatonina por quatro dias consecutivos. Avaliando o curso temporal da doença, foi observado que os camundongos infectados com a cepa PbA desenvolveram sinais neurológicos característicos entre 6 e 10 dias após a infecção, caracterizados por inatividade física, hemiplegia, ataxia, convulsões, coma e morte. A taxa de sobrevivência foi calculada a partir da determinação do número de animais que evoluíram a óbito no seu respectivo dia após a infecção (Figura 6A). Nossos resultados demonstram que os animais dos grupos Controle e Melatonina obtiveram 100% de sobrevivência até o final do experimento. Os animais do grupo PbA e PbA + DMSO 1% desenvolveram uma infecção aguda e letal atingindo uma taxa de mortalidade de 80% entre os dias 7-11 pós-infecção. Os demais 20% evoluíram a óbito até 15 dias após a infecção. Os animais infectados e tratados com melatonina nas doses de 5 e 10 mg/kg tiveram sua sobrevivência aumentada significativamente quando comparando ao grupo PbA. O tratamento com ambas as doses promoveu o deslocamento da curva para direita, com animais começando a evoluir a óbito no 9º d.p.i., chegando ao 11º dia com uma taxa de sobrevivência de 57% sem sinais neurológicos graves. O último animal de cada grupo tratado evoluiu a óbito somente

no 20° e 21° dia após a infecção, respectivamente. Evidenciando o efeito protetor da melatonina frente à progressão letal da doença.

A porcentagem da parasitemia foi monitorada para investigar se a melhora da sobrevida estava correlacionada à mudanças na taxa de parasitas no sangue periférico, (Figura 6B). No início da fase aguda da infecção (7° d.p.i.) os animais do grupo PbA e PbA + DMSO 1% atingiram respectivamente 16,76% e 25,33% de parasitemia, enquanto os animais infectados e tratados com melatonina nas doses de 5 e 10mg/kg/dia obtiveram uma taxa de 18,48% e 17,43%, respectivamente. No 12° d.p.i., determinado como o final da janela de fase aguda, a parasitemia do grupo PbA foi de 34,74%, enquanto que nos grupos tratados com melatonina em ambas as doses a taxa foi de 27,96% e 28,87% respectivamente. Em todas as análises nenhuma diferença significativa foi registrada entre os grupos, demonstrando que a melatonina não atua por ação antiparasitária.

Concomitante à análise da parasitemia, a variação da massa corpórea foi monitorada (Figura 6C). Durante os todos os dias de acompanhamento não foi observado diferença significativa entre os grupos infectados e o grupo controle. Também foi constatado que o tratamento com melatonina não exerceu efeito sobre o peso corporal médio de camundongos não infectados e camundongos infectados com a cepa PbA.

Visando caracterizar o quadro de MCE, os animais foram submetidos ao protocolo de RMCBS para avaliar o desenvolvimento dos sinais neurológicos associados à infecção (Figura 7). Todos os animais do grupo PbA apresentaram alterações características nos parâmetros avaliados. Foi possível notar que o tratamento com melatonina tanto na dose de 5mg/kg quanto na dose de 10mg/kg reduziu significativamente os danos cognitivos induzidos pela doença em todos os domínios funcionais avaliados durante a fase aguda (6° d.p.i.), como coordenação, desempenho motor, força e tônus muscular, reflexos e autopreservação e comportamento relacionado à higiene.

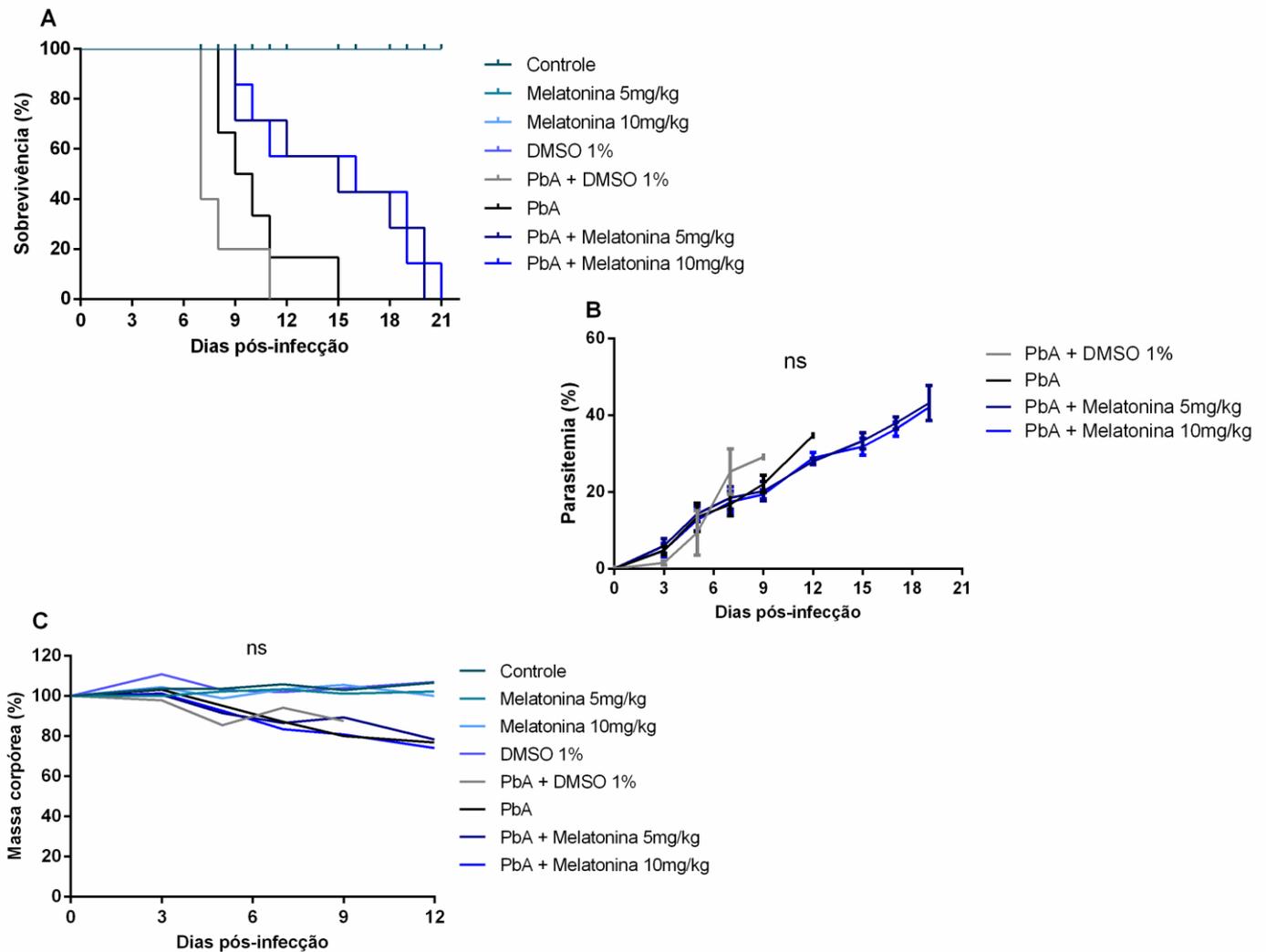


Figura 6: A melatonina prolongou a sobrevivência de camundongos infectados com *Plasmodium berghei*. Camundongos infectados com PbA foram tratados com melatonina a 5 e 10 mg/kg por 4 dias consecutivos. **(A)** Curva de sobrevivência de camundongos albino suíços infectados. A curva de sobrevivência melhorou após o tratamento com melatonina em comparação ao grupo PbA ($p \leq 0,05$, teste de Log-Rank). **(B)** Evolução da parasitemia em relação aos dias após a infecção dos camundongos Albino Suíço infectados com PbA. A curva de parasitemia não diferiu significativamente entre os grupos (ns, não significativo). **(C)** Variação do peso corporal durante a infecção (%). Determinação da massa corpórea durante os dias pós-infecção (%). Não houve variação da massa corpórea significativamente

durante a análise (ns, não significativo); (n= 8 animais / grupo). Os dados são apresentados como média \pm DP.

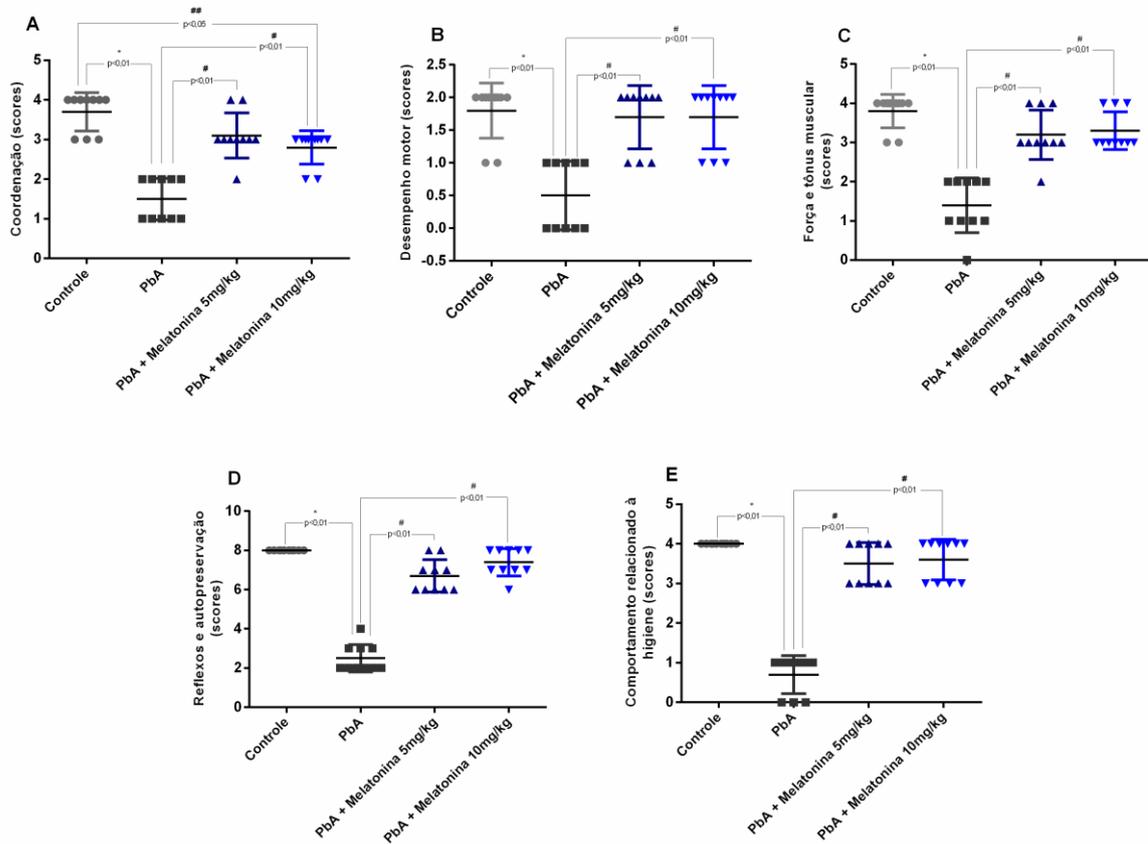


Figura 7: Avaliação dos sinais neurológicos a partir da utilização do protocolo RMCBS. Todos os indicadores foram significativamente reduzidos em camundongos infectados com PbA 6 dias após a infecção. O tratamento com melatonina melhorou todos os domínios analisados: **(A)** Coordenação, **(B)** Desempenho motor, **(C)** Força e tônus muscular, **(D)** Reflexos e autopreservação, **(E)** Comportamento relacionado à higiene. A soma dos escores de todos os parâmetros foi registrada como uma pontuação total para cada grupo (n= 10 animais / grupo). Os dados são apresentados como média \pm DP. * $p < 0,01$ vs. controle; # $p < 0,01$ vs. PbA; ## $p < 0,05$ vs. PbA.

4.2. MELATONINA PROTEGE CONTRA A QUEBRA DA BARREIRA HEMATOENCEFÁLICA E FORMAÇÃO DE EDEMA CAUSADA PELA INFECÇÃO COM PbA

O rompimento da BHE é um evento chave associado à malária cerebral, aqui avaliado com base na permeabilidade ao corante Azul de Evans. A Figura 8A representa qualitativamente a diferença entre o grupo infectado e os grupos tratados com melatonina nas doses de 5 e 10mg/kg. Nota-se que o grupo PbA apresentou uma intensa coloração, enquanto os grupos tratados apresentaram uma diminuição considerável de corante extravasado. O efeito da melatonina na permeabilidade da barreira foi corroborado pela quantificação das concentrações do marcador no encéfalo, realizado no 6° d.p.i. (Figura 8B). Os resultados demonstraram que o grupo PbA apresentou um aumento de aproximadamente 40% no extravasamento vascular cerebral, quando comparado ao grupo controle ($39,53 \pm 5,36 \mu\text{g/g}$ vs. $4,14 \pm 0,51 \mu\text{g/g}$). No entanto, o tratamento com melatonina em ambas as doses de 5 e 10mg/kg em animais infectados promoveu a diminuição significativa do extravasamento vascular em comparação ao grupo PbA ($6,77 \pm 1,16 \mu\text{g/g}$ e $2,96 \pm 1,12 \mu\text{g/g}$, respectivamente). Animais não infectados tratados com melatonina não apresentaram alterações significativas na estabilidade da BHE.

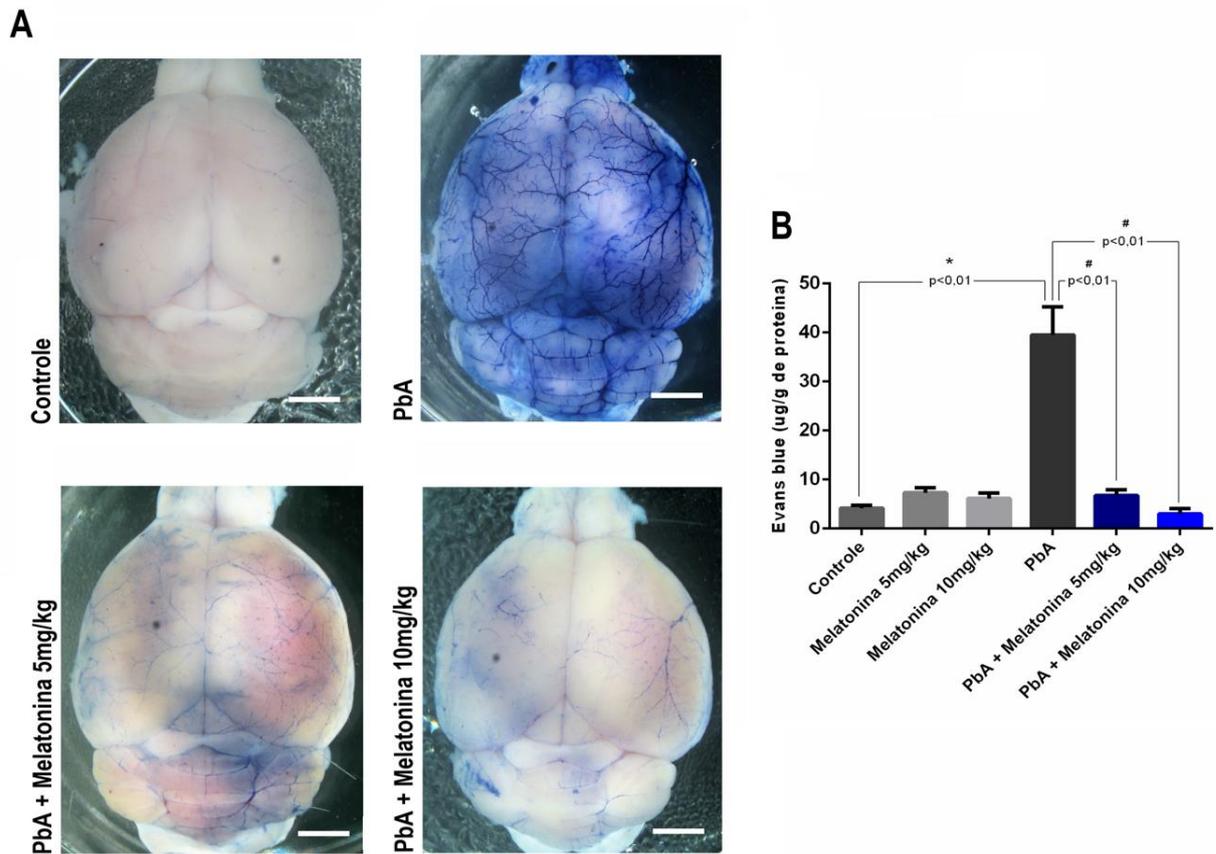


Figura 8: Avaliação do ensaio de permeabilidade vascular. A melatonina mantém a integridade da barreira hematoencefálica na ECM. **(A)** Análise qualitativa do extravasamento vascular de camundongos controle, infectados com a cepa PbA, camundongos infectados tratados com melatonina 5mg/kg e melatonina 10mg/kg. Barras de escala: 0,5 mm. **(B)** Quantificação do extravasamento Azul de Evans para o cérebro no 6º d.p.i. (n = 8 animais / grupo). O experimento foi repetido três vezes e submetido a ANOVA de uma via. Dados expressos em média \pm DP. * p <0,01 vs. controle; # p <0,01 vs. PbA.

A formação de edema encefálico foi avaliada como dado complementar para avaliar a integridade da BHE. A análise de conteúdo de água no cérebro realizada no 6º dia pós-infecção foi utilizada como indicador desta condição. Nossos resultados demonstraram que a infecção por PbA aumentou significativamente o conteúdo de água cerebral quando comparado ao grupo controle ($80,86 \pm 0,98$ vs. $78,07 \pm 0,42$) (Figura 9). Contudo, a administração da melatonina nas doses de 5mg/kg e 10 mg/kg promoveu uma diminuição significativa do teor de água no cérebro ($79,10 \pm 0,64$ e $78,52 \pm 0,49$, respectivamente) quando comparado ao grupo PbA, indicando que a melatonina melhora o edema cerebral induzido pela infecção.

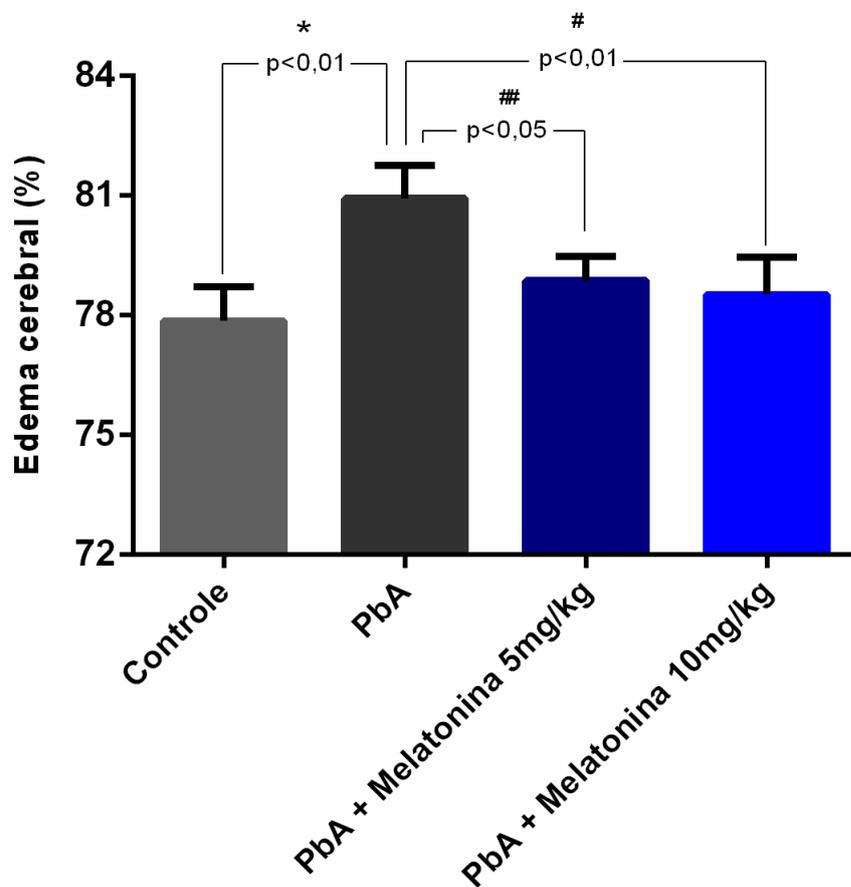


Figura 9: O tratamento com melatonina reduziu o edema cerebral na MCE. Avaliação do conteúdo de água no cérebro de camundongos foi realizada no 6º dia pós-infecção nos diferentes grupos. (n= 7 animais / grupo). Os dados são apresentados como média \pm DP. *p<0,01 vs. controle; #p<0,01 vs. PbA; ##p<0,05 vs. PbA.

4.3. MELATONINA ATENUA ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS EM ANIMAIS INFECTADOS COM A CEPA PbA

A análise histológica demonstrou que o quadro de MCE induziu uma desorganização tecidual e evidente vacuolização no córtex de camundongos infectados com a cepa PbA no 6º dia pós-infecção (Figura 10A). A presença de área de infiltrados, vasos ocluídos e focos hemorrágicos também foi observada e quantificada, apresentando-se significativamente maior no grupo PbA (Figura 10B) em detrimento do grupo controle. Entretanto, o tratamento com melatonina em ambas as doses atenuou todas as alterações histopatológicas induzidas pela infecção (Figura 10C).

Conforme a marcação de núcleo celular com DAPI, nossos resultados evidenciaram que a infecção com a cepa PbA gerou uma diminuição significativa do número de células no tecido nervoso de camundongos quando comparado ao grupo controle ($596 \pm 52,84$ vs. $1010,67 \pm 68,79$). No entanto, o tratamento com melatonina a 5 e 10mg/kg protegeu frente à perda celular induzida pela infecção ($857,33 \pm 47,64$ e $898,66 \pm 16,01$, respectivamente) apresentando um aumento significativo do número de células quando comparado ao grupo PbA (Figura 11).

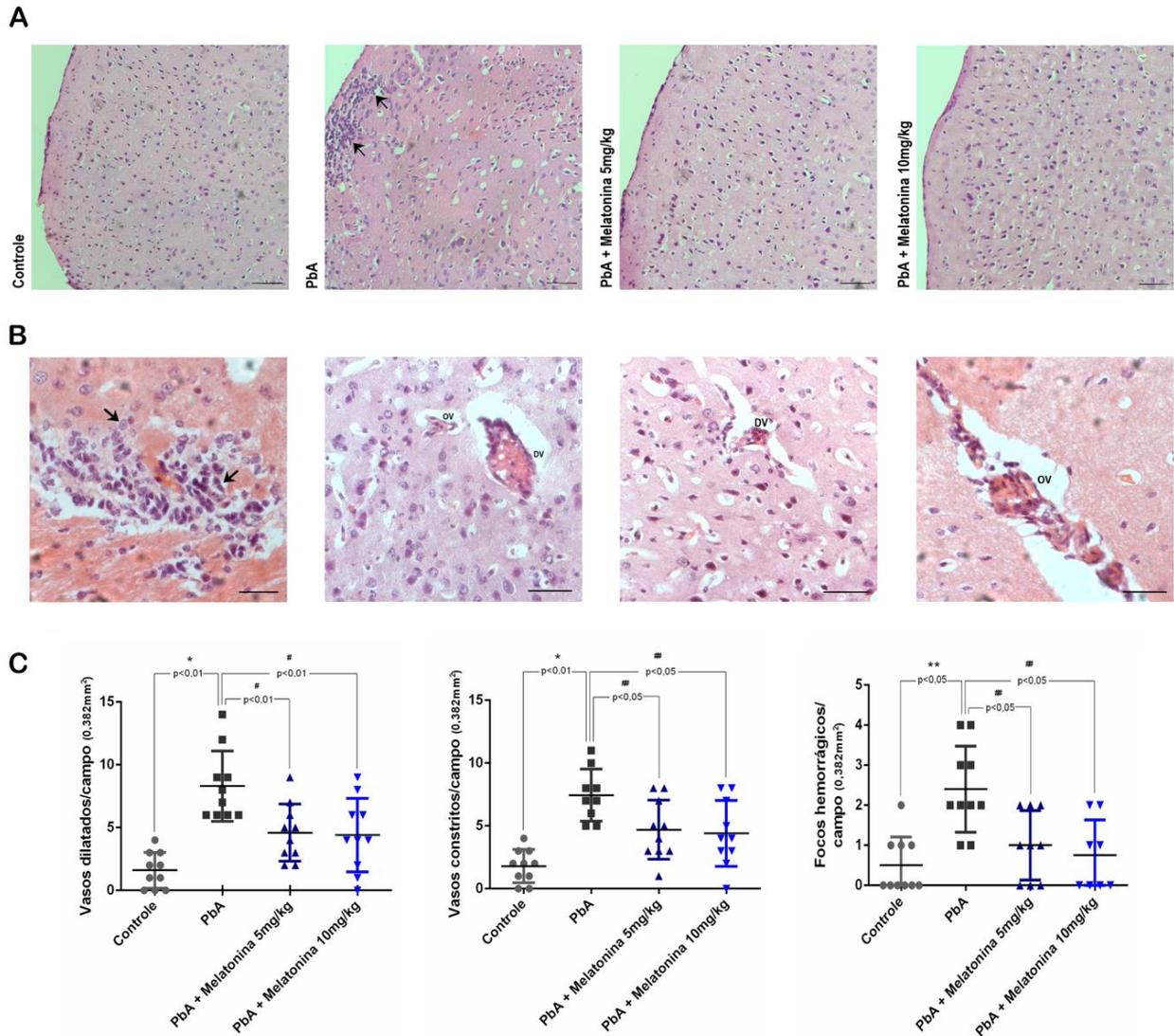


Figura 10: Tratamento com melatonina diminui alterações histopatológicas no cérebro de camundongos infectados com PbA. Microfotografias representativas do córtex cerebral de camundongos no 6º d.p.i. coradas com H&E. **(A)** Córtex cerebral de camundongos não infectados (Controle) com aparência histológica normal; Camundongos infectados com a cepa PbA mostrando presença de infiltrados celulares (setas) e vacuolização (asterisco); grupos tratados com melatonina nas doses de 5 e 10mg/kg apresentando redução das alterações; lente objetiva 20X. **(B)** Córtex cerebral de camundongos do grupo PbA apresentando áreas de infiltrados (setas. Lente objetiva 60X), vasos dilatados (DV. Lente objetiva 40X) e vasos ocluídos (OV. Lente objetiva 60X). **(C)** Quantificação do número de vasos dilatados, vasos ocluídos e focos hemorrágicos. (n= 10 animais / grupo. Dados expressos em média ± DP. * p<0,01 vs. controle; ** p<0,05 vs. controle; # p <0,01 vs. PbA; ## p<0,05 vs. PbA. (barras, 50 µm).

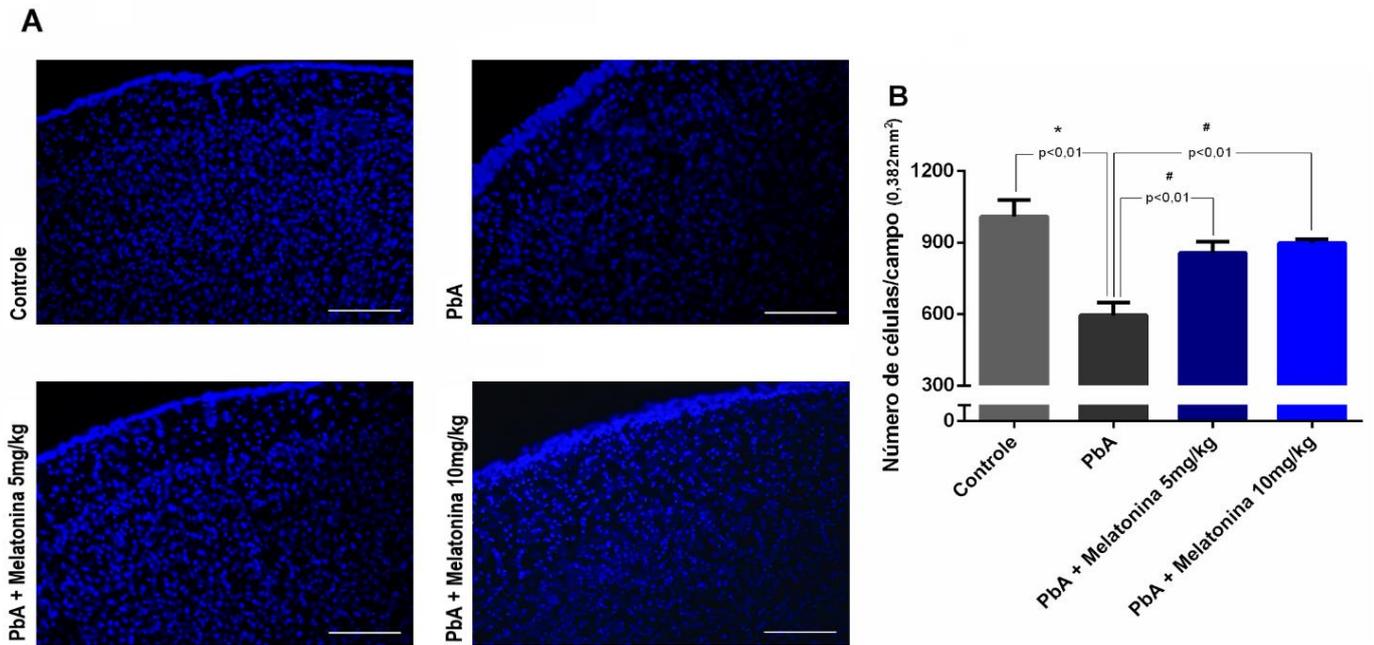


Figura 11: Análise do número total de células por área em cortes do cérebro usando coloração DAPI (lente objetiva 20X). **(A)** Os campos mais representativos da área cortical do cérebro são mostrados (barra de escala, 50 μ m). **(B)** Quantificação da coloração nuclear por DAPI em diferentes grupos utilizando o software ImageJ. Dados expressos em média \pm DP de três; n = 7 animais / grupo. * p<0,01 vs. controle; # p<0,01 vs. PbA.

4.4. TRATAMENTO COM MELATONINA ATENUA ALTERAÇÕES COMPORTAMENTAIS MOTORAS INDUZIDAS PELA INFECÇÃO COM PbA

Para avaliar as disfunções motoras geradas pela doença, os animais foram submetidos ao teste de campo aberto no 6º dia pós-infecção. No teste proposto, parâmetros como quadrantes cruzados (Figura 12A), grooming (Figura 12B) e lifting (Figura 12C) foram analisados nos grupos distintos. Os camundongos infectados com a cepa PbA apresentaram uma diminuição significativa da atividade locomotora, cruzando um menor número de quadrantes em comparação aos animais do grupo controle ($93,71 \pm 15,82$ vs. $260,42 \pm 22,08$). No entanto, camundongos tratados com melatonina nas diferentes doses de 5 e 10mg/kg obtiveram uma melhora significativa na atividade locomotora ($130,42 \pm 8,94$ e $142 \pm 11,38$, respectivamente) em comparação à camundongos pertencentes ao grupo PbA, mantendo a taxa de locomoção mais próxima da observada no grupo controle. Parâmetros adicionais relacionados ao comportamento motor foram avaliados, como frequência de grooming e lifting. Ambos padrões foram significativamente diminuídos em camundongos infectados com PbA (grooming: $17,42 \pm 3,86$; lifting: $8,26 \pm 2,56$) quando comparado ao grupo controle (grooming: $42 \pm 4,04$; lifting: $29,14 \pm 4,09$). No entanto, os animais infectados e tratados com melatonina apresentaram melhora significativa destes indicadores quando comparado ao grupo PbA. Animais não infectados tratados com melatonina em ambas as doses não apresentaram nenhuma alteração comportamental significativa. Os resultados demonstram que o tratamento com melatonina preveniu as disfunções motoras induzidas pela MCE.

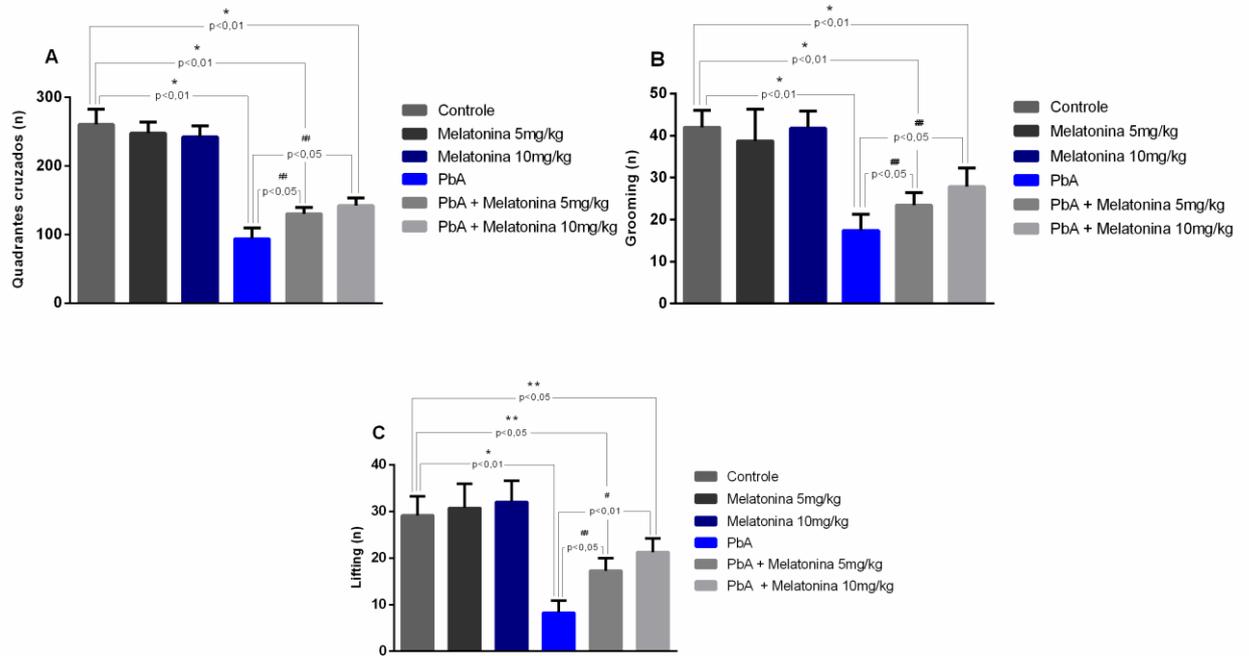


Figura 12: Efeito protetor da melatonina frente ao comprometimento motor em camundongos infectados com a cepa PbA 6 dias após a infecção. **(A)** Número de quadrantes cruzados, **(B)** frequência de *grooming* e **(C)** frequência de *lifting*, foram registrados e quantificados. (n= 8 animais / grupo). Dados expressos como média \pm DP. * $p < 0,01$ vs. controle; ** $p < 0,05$ vs. controle; # $p < 0,01$ vs. PbA; ## $p < 0,05$ vs. PbA.

5. DISCUSSÃO

Em nossa pesquisa observamos que a melatonina aumentou a sobrevivência dos animais sem alterar os níveis de parasitemia, reduziu os danos na barreira hematoencefálica, diminuindo o processo de extravasamento vascular e o quadro de edema encefálico, atenuou os danos histológicos e as alterações comportamentais induzidas pela infecção por PbA. Desta maneira, analisar o efeito da melatonina durante a evolução do quadro da malária cerebral é de extrema importância para avaliar os mecanismos envolvidos na patogênese da infecção, bem como para auxiliar na busca de aliados eficientes contra a doença, uma vez que, a ausência de um tratamento rápido e eficaz tornam as infecções por *P. falciparum* potencialmente fatais.

Apesar do tratamento antimalárico existente, as taxas de mortalidade associadas à infecções por *P. falciparum* permanecem altas em decorrência do tratamento tardio, principalmente em crianças e pacientes imunocomprometidos. Atualmente, o artesunato é o fármaco de primeira escolha para casos de malária severa, incluindo a malária cerebral. No entanto, o uso do medicamento não é capaz de evitar os danos centrais associados à infecção, bem como, o dano cognitivo-motor de longo prazo em pacientes que sobrevivem à síndrome (MURPHY et al., 2001; CARTER et al., 2005).

A busca por agentes terapêuticos que apresentem características de neuroproteção frente ao quadro de malária cerebral é de fundamental relevância visando evitar as sequelas neurológicas e a morte de pacientes acometidos pela doença (VARO et al., 2020). Essas terapias normalmente atuam diretamente em vias metabólicas que são alteradas pela presença do parasita no organismo do hospedeiro, um mecanismo que associado ao efeito antimalárico de fármacos de primeira escolha, pode reduzir as taxas de mortalidade e os danos comportamentais permanentes em pacientes com malária cerebral (JHON et al. 2010).

A melatonina, além de ser o principal neurohormônio autócrino liberado pela glândula pineal, possui característica anti-inflamatória e antioxidante, apresentando potencial de neuroproteção contra lesões do SNC por sua ação antiapoptótica. Este conjunto de propriedades atribui à molécula a característica de pleiotrópica (TAN et al., 2003; ESPOSITO & CUZZOCREA, 2010; ACUÑA- CASTROVIEJO et al., 2014;

SHUKLA et al., 2019). Neste trabalho utilizamos duas doses do hormônio uma vez que resultados prévios não demonstraram diferença entre ambas e relatamos, pela primeira vez, que o tratamento com melatonina é capaz de melhorar os sinais clínicos e disfunções neurocognitivas em camundongos infectados com a cepa PbA, protegendo contra a MCE.

A MCE é caracterizada pela quebra da BHE, edema cerebral e lesões de parênquima, que levam a danos no SNC (BAGOT et al., 2002; MARTINS et al., 2009). O período crítico da MC é estabelecido durante a fase aguda da infecção, quando a parasitemia atinge taxas entre 10 e 15%. Nesta fase, os animais apresentam sinais clínicos característicos, como paralisia dos membros, reflexo alterado, desvio da cabeça, convulsões e coma (AMPAWONG et al., 2014).

Para a caracterização do quadro de MCE, avaliamos a taxa de sobrevivência, níveis de parasitemia, associados aos sinais neurológicos característicos utilizando o protocolo RMCBS. Observamos que animais infectados com a cepa PbA apresentaram sintomas neurológicos e morreram entre os dias 8 e 11 pós-infecção com uma parasitemia baixa, de acordo com dados prévios (QUEIROZ et al., 2008). No entanto, camundongos tratados com melatonina apresentaram sobrevida aumentada durante a infecção aguda, com a predominância de óbitos entre 15 e 21 dias após a infecção, sem sinais de disfunção neurológica. Nossos resultados sugerem que a melatonina impede o desenvolvimento da MC, exercendo efeito protetor no SNC de camundongos infectados sem alterar a parasitemia e o peso corporal dos animais. Os animais tratados com melatonina provavelmente morreram de anemia grave, considerando os níveis elevados de parasitemia no estágio final da doença, resultados que corroboram estudos anteriores (DENDE et al., 2015; PAL et al., 2016). A não alteração dos níveis de parasitemia em nenhum estágio da doença pelo uso da melatonina pode ser explicado pela ausência de receptores para o hormônio na membrana do *P. berghei*, tornando o ciclo de vida do parasita um padrão assíncrono e não influenciável pelos níveis de melatonina (BAGNARESI et al. 2009).

Existe uma forte correlação entre a quebra da barreira hematoencefálica e a patogênese da MC tanto em humanos como em modelos experimentais murinos (MEDANA et al., 2006; DUNST et al., 2017). Embora os níveis de parasitemia fossem relativamente altos em camundongos infectados com PbA tratados com melatonina, houve uma redução significativa no rompimento da BHE no 6° d.p.i. após o tratamento

com melatonina, corroborando estudos que demonstram o hormônio como um agente que promove a manutenção da estabilidade da BHE em diversos modelos de patologias que acometem o SNC (ALLURI, et al., 2016; LIU et al., 2017).

Além disso, o edema encefálico resultante da alteração da estabilidade da BHE também é uma característica notória da MC (PENET et al., 2005). O dano está presente em pacientes infectados por *P. falciparum* e em camundongos submetidos a MCE (BROWN et al., 2002; SANNI et., 1998). Sugere-se que este quadro aconteça decorrente de danos às células endoteliais e desarranjo da BHE, permitindo que fluidos, proteínas plasmáticas e mediadores inflamatórios saiam do sistema vascular e atinjam o parênquima do SNC causando perda de função neuronal e, dependendo da gravidade, o estado de coma (SANNI, 2001). Van Der Heyde et al., (2006) associaram o edema encefálico aos processos inflamatórios resultantes da infecção, no qual a expressão exacerbada de citocinas promove uma instabilidade na BHE.

Observamos que os camundongos infectados apresentaram formação de edema encefálico significativo, corroborando dados publicados por SANNI, et al., (2004). No entanto, camundongos tratados com melatonina apresentaram diminuição significativa quando comparado ao grupo PbA. Resultado semelhante ao que fora obtido em modelo de injúria traumática cerebral, em que a melatonina mostrou ser eficaz frente ao quadro (DING et al., 2014). O mecanismo de proteção pode estar relacionado à regulação de proteínas de adesão das células do endotélio vascular, embora estudos adicionais precisam ser realizados para confirmar nossa hipótese.

O tratamento com melatonina também atenuou os danos histológicos cerebrais induzidos pela infecção por PbA. As alterações histopatológicas são características importantes no desenvolvimento da MC, ocorrem secundariamente à disfunção vascular e à exposição do parênquima aos infiltrados leucocitários e demais componentes do processo inflamatório (MARTINS et al., 2009; STRANGWARD et al., 2017). Embora nossos dados demonstrem que o tratamento com melatonina reduziu as alterações no córtex sugestivas de infiltração leucocitária, estudos adicionais utilizando coloração de células T CD45 e T CD8⁺ precisam ser realizados para melhor caracterizar esse efeito. Isso fornece evidências de que o tratamento com melatonina pode reduzir efetivamente a neuroinflamação cerebral associada à patologia da MC.

Os mecanismos pelos quais a melatonina protege a quebra da BHE e subsequentemente o edema cerebral e os danos histológicos durante o quadro da MC

podem estar associados à sua característica de livre difusão pelo endotélio vascular. A característica anfipática do hormônio que o permite cruzar a BHE, a membrana plasmática e compartimentos da célula, como a mitocôndria e núcleo pode ser a responsável por conferir proteção em diversos níveis (GUHA et al., 2006; DING et al., 2015).

A presença de alterações comportamentais em modelo murino durante o desenvolvimento da doença já é amplamente demonstrado por estudos prévios (DESRUISSEAU et al., 2008). São causadas por disfunções características como vasoconstrição, hipóxia e um ambiente pró-inflamatório vasoativo que geram essa alteração da permeabilidade e rompimento da BHE. Esse conjunto de fatores desencadeiam as complicações neurológicas e cognitivas bem características do quadro de MC (FALCHOOK et al., 2003; BOIVIN et al., 2007; PONSFORD et al., 2012). De acordo com ADAMS et al. (2002), o aumento da permeabilidade da BHE que ocorre no início da infecção pela cepa PbA induz danos celulares que persistem muito tempo após a infecção, podendo ser responsável pelos danos comportamentais persistentes associados à doença.

O RMCBS foi realizado para caracterizar o quadro de MCE. Este protocolo é considerado uma ferramenta importante para a avaliação do estado neurológico de camundongos com MC, haja vista que permite uma avaliação rápida e objetiva do desenvolvimento das alterações comportamentais na fase aguda da infecção (CARROLL et al., 2010). Nossos resultados demonstraram que os animais infectados com a cepa PbA apresentaram déficits em todos os domínios comportamentais avaliados.

O teste do campo aberto é utilizado para avaliar o desempenho motor dos animais (DESRUISSEAU et al., 2008). O teste mostrou que a infecção por PbA gerou prejuízo da capacidade exploratória dos animais, corroborando as alterações comportamentais observadas através da utilização do protocolo RMCBS. Os diferentes tipos de alterações comportamentais são diretamente relacionados à área do encéfalo afetada. Estudos anteriores demonstram que em modelos de patologias que geram alterações na BHE é comum observar um comprometimento comportamental desencadeado pelos danos neuronais resultantes da neuroinflamação exacerbada e ausência de oxigenação no córtex, mediada por lesões vasculares (VAN DER HEYDE et al., 2006).

No presente estudo, os camundongos infectados com PbA que receberam melatonina tiveram um desempenho que se assemelhou ao dos camundongos controle não infectados. O tratamento com o hormônio conseguiu promover proteção frente a todos os comprometimentos cognitivos e motores de longo prazo induzidos pela infecção. Estudos anteriores já demonstraram o papel protetor da melatonina frente a diversos danos comportamentais. Ali et al., (2015) mostrou que o tratamento crônico com melatonina atenuou o comprometimento comportamental induzido pela D-galactose, mediada pela diminuição da neuroinflamação e neurodegeneração através da via RAGE/NF- κ B/JNK. Um estudo publicado por Muhammad et al., (2018) demonstrou que o hormônio conseguiu promover a redução de alterações comportamentais induzidas pelo uso de Escapolamina via redução da neuroinflamação e estresse oxidativo.

O mecanismo exato pelo qual a melatonina promove proteção frente às alterações na MCE deve ser melhor investigado. Estudos anteriores demonstram que a capacidade de inativar a proteína mTOR confere ao hormônio a capacidade de proteção frente a uma neuroinflamação exacerbada, reduzindo a ativação de micróglias e a expressão de citocinas pró-inflamatórias (DING et al., 2014).

Em modelo murino de lesão cerebral hipóxico-isquêmica neonatal, a melatonina media o efeito neuroprotetor pela ativação dos receptores M1, o que inibe a ativação das vias de morte celular por apoptose, uma vez que promove a manutenção do potencial de membrana mitocondrial (SINHA et al., 2017).

Não podemos excluir o fato de que a neuroproteção da melatonina pode estar associada ao seu efeito antioxidante, uma vez que estudos anteriores já demonstraram que a administração diária de melatonina restaura a capacidade antioxidante e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias em um modelo experimental de retinopatia diabética (NEGI et al., 2011). Além disso, a melatonina é capaz de diminuir a expressão das isoformas Nox2 e Nox4, reduzir a geração de espécies reativas de oxigênio e inibir a morte celular por apoptose em um modelo murino de isquemia cerebral (LI et al., 2014).

A utilização exógena da melatonina já é amplamente utilizada em diversos modelos de neuropatologias, apresentando resultados promissores em doses baixas. Um estudo demonstrou que a deficiência de melatonina endógena exacerbou o dano neuronal em modelo de injúria traumática cerebral, fornecendo evidências notáveis da

eficácia da administração exógena. A administração exógena de melatonina nas doses de 5mg/kg e 10mg/kg por injeção intraperitoneal diminui o edema encefálico, o volume do infarto e melhorou os déficits neurológicos de camundongos após a lesão (REITER et al., 2003). Sua capacidade de proteção do SNC está associada à sua particularidade de molécula pleiotrópica, apresentando propriedades anti-inflamatórias, antiapoptóticas, antioxidantes e de característica regulatória de moléculas expressas no endotélio vascular, o que confere ao hormônio a capacidade de promover a manutenção da BHE e a proteção do parênquima cerebral.

Aqui relatamos pela primeira vez que a melatonina é capaz de melhorar os sinais clínicos e comprometimento neurocognitivo de camundongos infectados com PbA, resultando em proteção contra o quadro de MCE. O mecanismo exato pelo qual a melatonina exerce seu efeito neuroprotetor será investigado posteriormente.

6. CONCLUSÃO

Concluimos que a melatonina apresentou efeito neuroprotetor frente o quadro clínico de Malária Cerebral induzido por uma infecção com a cepa ANKA de *Plasmodium berghei* (PbA). Demonstramos que o tratamento com as diferentes doses do hormônio (5mg/kg e 10 mg/kg) promoveu o aumento da sobrevivência dos animais, protegeu frente ao rompimento da barreira hematoencefálica induzido pela infecção, impediu a formação de edema cerebral, reduziu as alterações histológicas do córtex de animais infectados e atenuou os danos neurocognitivos e motores associados à MCE. Desta forma, os dados atuais representam uma evidência pré-clínica importante de que a melatonina pode ser um aliado eficiente para o tratamento de MC.

7. REFERÊNCIAS

ACUÑA-CASTROVIEJO, D.; ESCAMES, G.; VENEGAS, C.; DÍAZ-CASADO, M.E.; LIMA-CABELLO, E.; LÓPEZ, L.C.; ROSALES-CORRAL, S.; TAN, D.X.; REITER, R.J. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cellular Molecular Life Sciences*, 71:2997-3025, 2014.

ADAMS, S.; BROWN, H.; TURNER, G. Breaking down the blood-brain barrier: signaling a path to cerebral malaria? *Trends in Parasitology*, 18(8): 360-6, 2002.

ALI, T.; BADSHAH, H.; KIM, T.H.; KIM, M.O. Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- κ B/JNK signaling pathway in aging mouse model. *Journal Pineal Research*, 58:71-85, 2015.

ALLURI, H.; WILSON, R.L.; SHAJI, C.A.; WIGGINS-DOHLVIK, K.; PATEL, S.; LIU, Y.; PENG, X.; BEERAM, M.R.; DAVIS, M.L.; HUANG, J.H.; THARAKAN, B. Melatonin preserves blood-brain barrier integrity and permeability via matrix metalloproteinase-9 inhibition. *PloS one*, 11(5):e0154427, 2016.

ALVARENGA, D. A. M., CULLETON, R., DE PINA-COSTA, A. An assay for the identification of *Plasmodium simium* infection for diagnosis of zoonotic malaria in the Brazilian Atlantic Forest. *Sci Rep*, 9(1):17521, 2019.

AMPAWONG, S.; CHAISRI, U.; VIRIYAVEJAKUL, P.; NONTPRASERT, A.; GRAU, G.E.; PONGPONRATN, E. Electron microscopic features of brain edema in rodent cerebral malaria in relation to glial fibrillary acidic protein expression. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 15:2056-2067, 2014.

ARMAH, H.; WIRED, E.K.; DODOO, A.K.; ADJEI, A.A.; TETTEY, Y.; GYASI, R. Cytokines and adhesion molecules expression in the brain in human cerebral malaria. *International journal of environmental research and public health*, 2(1):123-131, 2005.

BAGNARESI, P., ALVES, E., DA SILVA, H.B., EIPHANIO, S., MOTA, M.M., GARCIA, C.R. Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi*

infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int. J. Gen Med*, 2: 47–55, 2009.

BAGOT, S.; IDRISSE-BOUBOU, M.; CAMPINO, S.; BEHRSCHEMIDT, C.; GORGETTE, O.; GUÉNET, J.L.; PENHA-GONÇALVES, C.; MAZIER, D.; PIED, S.; CAZENAVE, P.A. Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infection and Immunity*, 70(4): 2049-56, 2002.

BARICHELLO, T., MACHADO, R. A., CONSTANTINO, L., VALVASSORI, S. S., RÉUS, G. Z., MARTINS, M. R., PETRONILHO, F., RITTER, C., QUEVEDO, J., & DAL-PIZZOL, F. (2007). Antioxidant treatment prevented late memory impairment in an animal model of sepsis. *Critical care medicine*, 35(9), 2186–2190.

BAVITHRA, S., SELVAKUMAR, K., SUNDARESWARAN, L., ARUNAKARAN, J. Neuroprotective effect of melatonin against PCBs induced behavioural, molecular and histological changes in cerebral cortex of adult male wistar rats. *Neurochemical research*, 42(2), 428-438, 2017.

BERNABEU, M., HOWARD, C., ZHENG, Y., SMITH, J.D. Bioengineered 3D Microvessels for Investigating *Plasmodium falciparum* Pathogenesis. *Trends in parasitology*, S1471-4922(20)30363-9, 2021.

BOIVIN, W.A.; GRANVILLE, D.J. Detection and Quantification of Apoptosis in the Vasculature. *Vascular Biology Protocols*, 139:181-195, 2007.

BOYSEN, K.E. & MATUSCHEWSKI, E. Inhibitor of Cysteine Proteases Is Critical for Motility and Infectivity of *Plasmodium* Sporozoites. *mBio*, 4(6): e00874-13, 2013.

BROWN, S.P.; HOCHBERG, M.E.; GRENFELL, B.T. Does multiple infection select for raised virulence? *Trends in microbiology*, 10(9):401-405, 2002.

CARTER, J.A.; ROSS, A.J.; NEVILLE, B.G.; OBIERO, E.; KATANA, K.; MUNG'ALAO-ODERA, V.; LEES, J.A.; NEWTON, C.R. Developmental impairments following severe *falciparum* malaria in children. *Tropical Medicine & International Health*, 1:3-10, 2005.

CARRILLO-VICO, A.; LARDONE, P. J.; GUERRERO, J. M. Melatonin: Buffering the Immune System. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4): 8638-8683, 2013.

CARROLL, R.W.; WAINWRIGHT, M.S.; KIM, K.Y.; KIDAMBI, T.; GÓMEZ, N.D.; TAYLOR, T.; HALDAR, K.A. Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. *Plos One*, 5:e13124, 2010.

CASTALDO, N., TASCINI, C., DELLA-SIEGA, P., PEGHIN, M., PECORI, D. Clinical presentation and immunological features of Post-Malaria Neurologic Syndrome: a case report and review of literature. *Malaria Journal*, 19(1): 1-11, 2020.

CLARK, I.A.; ALLEVA, L.M. Is human malarial coma caused, or merely deepened, by sequestration? *Trends Parasitol*, 25:314–318, 2009.

CUESTA, S., KIREEV, R., GARCÍA, C., FORMAN, K., ESCAMES, G., VARA, E., TRESGUERRES, J.A. Beneficial effect of melatonin treatment on inflammation, apoptosis and oxidative stress on pancreas of a senescence accelerated mice model. *Mechanisms of ageing and development*, 132(11-12): 573-582, 2011.

COMBES, V., DE SOUZA, J.B., RÉNIA, L., HUNT, N.H., GRAU, G.E. Cerebral malaria: Which parasite? Which model?. *Drug Discovery Today: Disease Models*, 2(2): 141-147, 2005.

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

DE SOUSA, L.P., DE ALMEIDA, R.F., RIBEIRO-GOMES, F.L., DE MOURA CARVALHO, L.J., SOUZA, T.M., DE SOUZA, D.O.G., DANIEL-RIBEIRO, C.T. Long-term effect of uncomplicated *Plasmodium berghei* ANKA malaria on memory and anxiety-like behaviour in C57BL/6 mice. *Parasites & vectors*, 11(1), 1-9, 2018.

DENDE, C., MEENA J., NAGARAJAN, P., PANDA, A.K., RANGARAJAN, P.N., PADMANABAN, G. Simultaneously targeting inflammatory response and parasite sequestration in brain to treat experimental cerebral malaria. *Sci Rep*, 5:12671, 2015.

DESRUISSEAU, M.S., GULINELLO, M., SMITH, D.N., LEE, S.C., TSUJI, M., WEISS, L.M., SPRAY, D.C., TANOWITZ, H.B. Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. *J Infect Dis*, 197(11):1621-7, 2008.

DING, K.; WANG, H.; XU, J.; LU, X.; ZHANG, L.; ZHU, L. Melatonin reduced microglial activation and alleviated neuroinflammation induced neuron degeneration in experimental traumatic brain injury: Possible involvement of mTOR pathway. *Neurochemistry International*, 76:23-31, 2014.

DING, K.; XU, J.; WANG, H.; ZHANG, L.; WU, Y.; LI, T. Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice. *Neurochemistry International*, 91: 46-54, 2015.

DUNST, J.; KAMENA, F.; MATUSCHEWSKI, K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7:324, 2017.

ENGWERDA, C.; BELNOUE, E., GRUNER, A.C., RENIA, L. Experimental models of cerebral malaria. *Curr Top Microbiol Immunol*, 297: 103–43, 2005.

ESPOSITO, E., CUZZOCREA, S. Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* 8: 228–242, 2010.

FALCHOOK, G.S.; MALONE, C.M.; UPTON, S.; SHANDERA, W.X. Postmalaria neurological syndrome after treatment of *Plasmodium falciparum* malaria in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 37(2): e22-e24, 2003.

FISCHER, T.W.; KLESZCZYŃSKI, K.; HARDKOP, L.H.; KRUSE, N.; ZILLIKENS, D. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *Journal Pineal Research*, 54:303-312, 2013.

FU, Z.; JIAO, Y.; WANG, J.; ZHANG, Y.; SHEN, M.; REITER, R.J.; XI, Q.; CHEN, Y. Cardioprotective Role of Melatonin in Acute Myocardial Infarction. *Front Physiol*, 29: 11:366, 2020.

- GARCIA, L.S. Malaria. *Clinics in Laboratory Medicine*, 30(1):93-129, 2010.
- GAY, F., ZOUGBÉDÉ, S., N'DILIMABAKA, N., REBOLLO, A., MAZIER, D., MORENO, A. Cerebral malaria: What is known and what is on research. *Revue Neurologique*, 168(3): 239–256, 2012.
- GHAZANFARI, N., MUELLER, S.N., HEATH, W.R. Cerebral Malaria in Mouse and Man. *Front Immunol*, 9:2016, 2018.
- GOMES A. P., VITORINO R. R., COSTA A. P., MENDONÇA E. G., OLIVEIRA M. G. A., SIQUEIRA-BATISTA R. Severe Plasmodium falciparum malaria. *Revista Brasileira de Terapia Intensiva*, 23(3): 358-369, 2011.
- GORDON, E.B., HART, G.T., TRAN, T.M., WAISBERG, M., AKKAYA, M., KIM AS, HAMILTON, S.E., PENA, M., YAZEW, T., QI CF, LEE CF, LO YC, MILLER LH, POWELL JD, AND PIERCE SK. 2015. Targeting glutamine metabolism rescues mice from late-stage cerebral malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112: 13075–13080, 2015.
- GUHA, M.; KUMAR, S.; CHOUBEY, V.; MAITY, P.; BANDYOPADHYAY, U. Apoptosis in liver during malaria: role of oxidative stress and implication of mitochondrial pathway. *The FASEB Journal*, 20, 439–449. 2006.
- HALDAR, K.; MURPHY, F.C.; MILNER, D.A.; TAYLOR, T.E. Malaria: mechanisms of erythrocytic infection and pathological correlates of severe disease. *Annual Review of Pathology*, 2: 217-49, 2007.
- HE, P., OUYANG, X., ZHOU, S., YIN, W., TANG, C., LAUDON, M., TIAN, S. A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive impairment in a rat model of Alzheimer's disease. *Hormones and Behavior*, 64(1): 1-7, 2013.
- HENRIQUES, F.G. Manifestações neurológicas da malária. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria*, 30(4), 305-314, 1972.
- HORA, R., KAPOOR, P., THIND, K. K., MISHRA, P. C. Cerebral malaria – clinical manifestations and pathogenesis. *Metabolic Brain Disease*, 31(2):225- 37, 2016.

HOWLAND, S.W., CLASER, C., POH, C.M., GUN, S.Y., RÉNIA, L. Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol*, 37:221–31, 2015.

HUNT, N.H., GRAU, G.E. Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol*, 24: 491–499, 2003.

HUNT, N.H., GRAU, G.E., ENGWERDA, C., BARNUM, S.R., VAN DER HEYDE, H., HANSEN, D.S., SCHOFIELD, L., GOLENSER, J. Murine cerebral malaria: the whole story. *Trends Parasitol*, 26 (6): 272-4, 2010.

IDRO, R., MARSH, K., JOHN, C. C., NEWTON, C. R. Cerebral malaria: mechanisms of brain injury and strategies for improved neurocognitive outcome. *Pediatr Res*, 68(4): 267-274, 2010.

IRIBHOGBE OI, AGBAJE EO, OREAGBA IA, AINA OO, OTA AD. Oxidative stress and micronutrient therapy in malaria: an in vivo study in *Plasmodium berghei* infected mice. *Pak J Biol Sci* 16(4):160–16, 2013.

JIMENEZ-JORGE, S.; GUERRERO, J.M.; JIMENEZ-CALIANI, A.J.; NARANJO, M.C.; LARDONE, P.J.; CARRILLO-VICO, A.; OSUNA, C.; MOLINERO, P. Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *Journal Pineal Research*, 42:240-246, 2007.

JOHN, C.C.; BANGIRANA, P.; BYARUGABA, J.; OPOKA, R.O.; IDRO, R.; JUREK, A.M.; WU, B.; BOIVIN, M.J. Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics*, 122:92-99, 2008.

KIM, H., ERDMAN, L.K., LU, Z., SERGHIDES, L., ZHONG, K., DHABANGI, A., KAIN, K.C. Functional roles for C5a and C5aR but not C5L2 in the pathogenesis of human and experimental cerebral malaria. *Infection and immunity*, 82(1): 371-379, 2014.

LI, H., WANG, Y., FENG, D., LIU, Y., XU, M., GAO, A., CHEN, G. Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin. *J. Pineal Res*, 57: 110–119, 2014.

LIU, W.C.; WANG, X.; ZHANG, X.; CHEN, X.; JIN, X. Melatonin supplementation, a strategy to prevent neurological diseases through maintaining integrity of blood brain barrier in old people. *Frontiers in aging neuroscience*, 9:165, 2017.

LUO F, SANDHU AF, RUNGRATANAWANICH W, WILLIAMS GE, AKBAR M, ZHOU S, SONG BJ, WANG X. Melatonin and Autophagy in Aging-Related Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci*, 21(19): 7174, 2020.

MARTINS, Y.C.; CARVALHO, L.J.M.; 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*, 16: 134-145, 2009.

MARTINS, Y.C.; SMITH, M.J.; PELAJO-MACHADO, M.; WERNECK, G.L.; LENZI, H.L.; DANIEL-RIBEIRO, C.T.; CARVALHO, L.J.M.C. Characterization of cerebral malaria in the outbred Swiss Webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *International Journal of Experimental Pathology*, 90(2): 119– 130, 2009a.

MEDANA, I.M.; CHAUDHRI, G., CHAN-LING, T., HUNT, N.H. Central nervous system in cerebral malaria: “innocent bystander” or active participant in the induction of immunopathology. *Immunology and Cell Biology*, 79: 101- 120, 2006.

MILLER, L.H.; BARUCH, D.J.; MARSH, K.; DOUMBO, O.K. The pathogenic basis of malaria. *Nature*, 415: 673-679, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil), Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica, 2020.

MIRANDA A. S., QUEIROZ N. L., RACHID M. A., TEIXEIRA A. L. Acute and residual neurological symptoms in malaria. *Revista Brasileira de Neurologia*, 46(3): 35-41, 2010.

MISHRA, N., SINGH, J.P.N., SRIVASTAVA, B., ARORA, U., SHAH, N.K., GHOSH, S.K., VALECHA, N. Monitoring antimalarial drug resistance in India via sentinel sites: outcomes and risk factors for treatment failure, 2009-2010. *Bulletin of the World Health Organization*, 90:895-904, 2012.

MOTA, M.M.; PRADEL, G.; VANDERBERG, J.P.; HAFALLA, J.C.; FREVERT, U., NUSSENZWEIG, R.S.; RODRIGUÉZ, A. Migration of *Plasmodium* sporozoites through cell before infections. *Science*, 291:141-4, 2001.

MUHAMMAD, T.; ALI, T.; IKRAM, M.; KHAN, A.; ALAM, S.I.; KIM, M. O. Melatonin Rescue Oxidative Stress-Mediated Neuroinflammation/Neurodegeneration and Memory Impairment in Scopolamine-Induced Amnesia Mice Model. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 1-17, 2018.

MURPHY, S.C.; BREMAN, J.G. Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 64:57-67, 2001.

NEGI, G., KUMAR, A., SHARMA, S.S. Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. *J. Pineal Res*, 50:124–131, 2011.

NISHANTH, G., SCHLÜTER, D. Blood-Brain Barrier in Cerebral Malaria: Pathogenesis and Therapeutic Intervention. *Trends Parasitol*, 35(7):516- 528, 2019.

OLIVEIRA, K. R. H. M., KAUFFMANN, N., LEÃO, L. K. R., ADELAIDE C. F. PASSOS, FERNANDO, A. F. R., ANDERSON M. H., DO NASCIMENTO, J. L. M. Cerebral malaria induces electrophysiological and neurochemical impairment in mice retinal tissue: possible effect on glutathione and glutamatergic system. *Malar J*,16(1):440, 2017.

PAIS, T.F., PENHA-GONÇALVES, C. Brain Endothelium: The "Innate Immunity Response Hypothesis" in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Immunol*, 9:3100, 2019.

PENET, M.F., VIOLA, A., CONFORT-GOUNY, S., LE FUR, Y., DUHAMEL, G., KOBER, F., COZZONE, P.J. Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *Journal of Neuroscience*, 25(32): 7352-7358, 2005.

PONSFORD, J.; TWEEDLY, L.; LEE, N.; TAFFE, J. Who responds better? Factors influencing a positive response to brief alcohol interventions for individuals with traumatic brain injury. *The Journal of head trauma rehabilitation*, 27(5):342-348, 2012.

QUEIROZ, N. L., TEIXEIRA, M. M., TEIXEIRA, A. L. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Revista Brasileira de Neurologia*, 44(1): 13-19, 2008.

RADOGNA, F.; DIEDERICH, M.; GHIBELLI, L. Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochemical Pharmacology*, 80:1844-1852, 2010.

REIS, P. A., ESTADO, V., DA SILVA, T. I. Statins decrease neuroinflammation and prevent cognitive impairment after cerebral malaria. *PLoS Pathog*, 8(12), 2012.

REITER RJ, ACUÑA-CASTROVIEJO D, TAN DX, BURKHARDT S. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci*, 939: 200-15, 2001.

REITER, R.J., SAINZ, R.M., LOPEZ-BURILLO, S., MAYO, J.C., MANCHESTER, L.C., TAN, D.X. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke. *Ann N. Y. Acad. Sci*, 993:35–47, 2003.

RIGGLE, B. A., MILLER, L. H., & PIERCE, S. K. Desperately Seeking Therapies for Cerebral Malaria. *Journal of immunology* , 204(2), 327–334, 2020.

RUDNITSKAYA, E.A.; MURALEVA, N.A.; MAKSIMOVA, K.Y.; KISELEVA, E.; KOLOSOVA, N.G.; STEFANOVA, N.A. Melatonin Attenuates Memory Impairment, Amyloid- β Accumulation, and Neurodegeneration in a Rat Model of Sporadic Alzheimer's Disease. *Journal Alzheimers Disease*, 47:103-116, 2015.

SADANAND, S. Combating Evolving Pathogens: Malaria: An Evaluation of the Current State of Research on Pathogenesis and Antimalarial Drugs. *The Yale journal of biology and medicine*, 83(4):185, 2010.

SAMANTARAY, S.; DAS, A.; THAKORE, N.P.; MATZELLE, D.D.; REITER, R.J.; RAY, S.K.; BANIK, N.L. Therapeutic potential of melatonin in traumatic central nervous system injury. *Journal Pineal Research*, 47:134-142, 2008.

SANNI, L.A.; JARRA, W.; LI, C.; LANGHORNE, J. Cerebral edema and cerebral hemorrhages in interleukin-10-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi*. *Infection and immunity*, 72(5): 3054-3058, 2004.

SANNI, L.A. The role of cerebral edema in the pathogenesis of cerebral malaria. *Redox report*, 6(3):137-142, 2001.

SANNI, L.A.; THOMAS, S.R.; TATTAM, B.N.; MOORE, D.E.; CHAUDHRI, G.; STOCKER, R.; HUNT, N.H. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria. *The American journal of pathology*, 152(2):611, 1998.

SCHIESS, N., VILLABONA-RUEDA, A., COTTIER, K.E., HUETHER, K., CHIPETA, J., STINS, M.F. Pathophysiology and neurologic sequelae of cerebral malaria. *Malaria journal*, 19(1): 266, 2020.

SHUKLA, M., CHINCHALONGPORN, V., GOVITRAPONG, P., REITER R.J. The role of melatonin in targeting cell signaling pathways in neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci*, 1443: 75–96, 2019.

SINHA, B.; WU, Q.; LI, W.; TU, Y.; SIRIANNI, A.C.; CHEN, Y.; JIANG, J.; ZHANG, X.; CHEN, W.; ZHOU, S.; REITER, R.J.; MANNING, S.M.; PATEL, N.J.; AZIZ-SULTAN, A.M.; INDER, T.E.; FRIEDLANDER, R.M.; FU, J.; WANG, X. Protection of melatonin in experimental models of newborn hypoxic-ischemic brain injury through MT1 receptor. *Journal Pineal Research*, 64: 2017.

SOUZA, T.L., GRAUNCKE, A.C.B., RIBEIRO, L.R., MELLO, F.K., OLIVEIRA, S.M., BRANT, F., MACHADO, F.S., OLIVEIRA, M.S. Cerebral Malaria Causes Enduring Behavioral and Molecular Changes in Mice Brain Without Causing Gross Histopathological Damage. *Neuroscience*, 369:66-75, 2018.

STRANGWARD, P., HALEY, M.J., SHAW, T.N., SCHWARTZ, J.M., GREIG, R., MIRONOV, A., DE SOUZA, J.B., CRUICKSHANK, S.M., CRAIG, A.G., MILNER, J., ALLAN, S.M., COUPER, K.N. A quantitative brain map of experimental cerebral malaria pathology. *PLoS Pathog*, 8;13(3):e1006267, 2017.

SWEENEY, M. D., ZHAO, Z., MONTAGNE, A., NELSON, A. R., ZLOKOVIC, B. V. Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. *Physiol Rev*, 99(1):21-78, 2019.

TAN, D.X.; MANCHESTER, L.C.; HARDELAND, R.; LOPEZ-BURILLO, S.; MAYO, J.C.; SAINZ, R.M.; REITER, R.J. Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *Journal Pineal Research*, 34:75-78, 2003.

TUTEJA, R. Malaria: an overview. *FESB Journal*, 274: 4670-4679, 2007.

VAN DER HEYDE, H. C.; NOLAN, J.; COMBES, V.; GRAMAGLIA, I., GRAU, G. E. Aunified hypothesis for the genesis of cerebral malaria: sequestration, inflammation and hemostasis leading to microcirculatory dysfunction. *Trends in Parasitology*, 22(11): 503-8, 2006.

VARO, R., ERICE, C., JOHNSON, S., BASSAT, Q., KAIN, K.C. Clinical trials to assess adjuvant therapeutics for severe malaria. *Malaria journal*, 19(1): 268, 2020.

VINCKE, I.H.; LIPS, M. Un nouveau Plasmodium d'un rongeur sauvage du Congo: *P. berghei* n. sp. *Annales de la Societe Belge de Medecine Tropicale*. 28(1):97–104, 1948.

WALTHER, B.; WALTHER, M. What does it take to control malaria? *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 101(8):657-672, 2007.

WANG, X.; SIRIANNI, A.; PEI, Z.; CORMIER, K.; SMITH, K.; JIANG, J.; ZHOU, S.; WANG, H.; ZHAO, R.; YANO, H.; KIM, J.E.; LI, W.; KRISTAL, B.S.; FERRANTE, R.J.; FRIEDLANDER, R.M. The melatonin MT1 receptor axis modulates mutant Huntingtin-mediated toxicity. *Journal Neuroscience*, 31:14496-14507, 2011.

WHITE, N.J.; PUKRITTAYAKAMEE, S.; HIEN, T.T.; FAIZ, M.A.; MOKUOLU, O.A.; DONDORP, A.M. Malaria. *Lancet*; 383: 723–35, 2014.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO) Guidelines for the treatment of malaria. 2010.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report, 2017; 2018.

WORLD HEATH ORGANIZATION (WHO). World Malaria Report, 2020; 2020.

ZHANG, H.M.; ZHANG, Y. Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *Journal Pineal Research*, 57:131–146, 2014.



Melatonin Prevents Brain Damage and Neurocognitive Impairment Induced by *Plasmodium Berghei* ANKA Infection in Murine Model of Cerebral Malaria

Brenda Jaqueline de Azevedo Ataide¹, Nayara Kauffmann¹,
Nívia de Souza Franco Mendes¹, Marjorie Lujan Marques Torres^{1,2},
Larissa Medeiros dos Anjos^{1,2}, Adelaide da Conceição Fonseca Passos¹,
Suellen Alessandra Soares de Moraes¹, Evander de Jesus Oliveira Batista²,
Anderson Manoel Herculano¹ and Karen Renata Herculano Matos Oliveira^{1*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Philippe E. Van Den Steen,
KU Leuven, Belgium

Reviewed by:

Renato Augusto DaMatta,
State University of the North
Fluminense Darcy Ribeiro, Brazil
Martha Legorreta-Herrera,
National Autonomous University of
Mexico, Mexico

*Correspondence:

Karen Renata Herculano Matos
Oliveira
oliveirakrm@gmail.com;
karen@ufpa.br

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and Infection
Microbiology

Received: 09 March 2020

Accepted: 18 August 2020

Published: 30 September 2020

Citation:

Ataide BJdA, Kauffmann N,
Mendes NdSF, Torres MLM, dos
Anjos LM, Passos AdCF, de
Moraes SAS, Batista EdJO,
Herculano AM and Oliveira KRHM
(2020) Melatonin Prevents Brain
Damage and Neurocognitive
Impairment Induced by *Plasmodium*
Berghei ANKA Infection in Murine
Model of Cerebral Malaria.
Front. Cell. Infect. Microbiol.
10:541624.
doi: 10.3389/fcimb.2020.541624

¹Laboratory of Experimental Neuropharmacology, Biological Science Institute, UFPA, Belém, Brazil, ²Laboratory of Protozoology, Topical Medicine Nucleus, UFPA, Belém, Brazil

Cerebral malaria is characterized by permanent cognitive impairments in *Plasmodium*-infected children. Antimalarial therapies show little effectiveness to avoid neurological deficits and brain tissue alterations elicited by severe malaria. Melatonin is a well-recognized endogenous hormone involved in the control of brain functions and maintenance of blood–brain barrier integrity. The current study has evaluated the effect of melatonin on the histological alterations, blood–brain barrier leakage, and neurocognitive impairments in mice developing cerebral malaria. Swiss mice infected with *Plasmodium berghei* ANKA strain was used as cerebral malaria model. Melatonin treatment (5 and 10 mg/kg) was performed for four consecutive days after the infection, and data have shown an increased survival rate in infected mice treated with melatonin. It was also observed that melatonin treatment blocked brain edema and prevented the breakdown of blood–brain barrier induced by the *Plasmodium* infection. Furthermore, hematoxylin and eosin staining revealed that melatonin mitigates the histological alterations in *Plasmodium*-infected animals. Melatonin was also able to prevent motor and cognitive impairments in infected mice. Taken together, these results show for the first time that melatonin treatment prevents histological brain damages and neurocognitive alterations induced by cerebral malaria.

Keywords: cerebral malaria, melatonin, blood–brain barrier, neurobehavioral impairment, *Plasmodium*

INTRODUCTION

Malaria is a potentially life-threatening disease affecting an estimated 207 million people each year (WHO, 2017). Majority of the fatal cases were due to cerebral malaria (CM), which is the most severe neurological complication of *Plasmodium falciparum* infection that affects mainly children under 5 years of age (WHO, 2000; Idro et al., 2005). Major clinical symptoms of CM include dyspnea, fever, sudden bleeding, disorientation, convulsions, coma, and death. CM survivors could

exhibit long-term neurocognitive impairments such as cortical blindness, hearing loss, ataxia, and memory and attention disorders, which is partly due to the fact that antimalarial drugs do not prevent the damages in the central nervous system (CNS) parenchyma (John et al., 2008; Rénia et al., 2012). The mechanism of CM-induced brain injuries is still not fully understood. However, previous studies reveal that increased cytoadherence of parasitized red blood cells (pRBC) leads to brain microvascular obstruction, hypoxia state, and consequent damage of the brain structures. Data from literature also describe the role of proinflammatory cytokines, microglial activation, and oxidative stress on the pathogenicity of CM (Hunt and Grau, 2003).

Most of these neuropathological mechanisms associated with CM were clarified utilizing animal models that simulate the clinical signals described in humans developing CM. Experimental cerebral malaria (ECM) can be developed by using the rodent malaria model with the infection of susceptible mouse strains as C57BL/6 and Swiss albino mice with *Plasmodium berghei* ANKA parasites (Combes et al., 2005; Martins et al., 2009a,b). The mouse model exhibit several of the neurological features of human cerebral malaria (HCM) such as brain neuroinflammation (Hunt and Grau, 2003), reduced cerebral blood flow, blood–brain barrier (BBB) disruption, microhemorrhages (Hunt et al., 2006), brain swelling, and neurological impairment (Desruisseaux et al., 2008; Dai et al., 2010). In this context, the use of endogenous compounds with recognized ability to protect CNS parenchyma could exert significant protection against the brain damage and cognitive impairments evoked by CM.

Melatonin (N-acetyl-5-methoxytryptamine) is an endogenous neuro-hormone primarily synthesized and released from the pineal gland of mammals during the dark phase of the light–dark cycle (Rodriguez et al., 2004). In addition to the pineal gland, melatonin could be released at several extrapineal sites at the CNS, including hypothalamus, cerebellum, retina, nucleus gracilis, medulla oblongata, and cerebral cortex, modulating several neurophysiological roles (Jimenez-Jorge et al., 2007; Radogna et al., 2010). Furthermore, previous studies also describe that melatonin could act as a neuroprotective molecule in both acute brain injuries as cerebral ischemia and chronic neurodegenerative conditions such as Alzheimer and Huntington disease (Wang et al., 2011; Rudnitskaya et al., 2015). Moreover, melatonin could effectively reduce brain inflammation by inhibiting nuclear factor kappa B (NF- κ B) translocation and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation in lipopolysaccharide (LPS)-induced inflammation in both *in vivo* and *in vitro* experimental models (Chang et al., 2012). This indoleamine is also effective in reducing oxidative stress by increasing the activity and expression of several antioxidant enzymes such as superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase (Fischer et al., 2013; Zhang and Zhang, 2014). Melatonin has been implicated in cognitive events as learning process and memory formation as well as ameliorating motor coordination after brain injuries (He et al., 2013; Bavithra et al., 2017). In the rat model of hypoxia–ischemia, melatonin treatment

efficiently decreases brain damage by the modulation of BBB integrity.

Recently, a report also demonstrated that melatonin treatment could modulate the progression of infectious disease such as amoebiasis, leishmaniasis, and trypanosomiasis (Daryani et al., 2018). During a rat chronic infection with *Trypanosoma cruzi*, melatonin attenuates oxidative stress condition and the inflammatory process by decreasing nitric oxide and lipid peroxidation and raising the release of interleukin-17A (Brazão et al., 2015).

In malaria infection, melatonin displays a controversial role in the growth and development of some *Plasmodium* species. It has been described that endogenous melatonin modulates the parasite life cycle and maintain the synchronicity of *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium chabaudi*, which assure the propagation of the infection in the host (Beraldo et al., 2005; Budu et al., 2007). In spite of that, a previous study showed that melatonin does not synchronize experimental malaria infection caused by *Plasmodium berghei* and *Plasmodium yoelii* (Bagnaresi et al., 2009). Recent studies have demonstrated that melatonin-derived synthetic indoles, which modulate the activation of melatonin receptors, inhibited *in vitro* *P. falciparum* growth at lower concentrations (Schuck et al., 2014; Luthra et al., 2019), emerging as new alternative therapeutic approach to alter disease progression. Little is known about the effect of melatonin in the host infected with *Plasmodium*, which mainly concerns the cerebral impairment elicited by the disease.

Taken together, all of these findings prompted us to ask if melatonin treatment is able to modulate the progression of the disease by preventing histological alteration and neurocognitive impairments elicited by CM in mice.

MATERIALS AND METHODS

Experimental Animals

Male Swiss albino mice 5–6 weeks old (weighing 20–24 g) were obtained from the Animal Care Facilities of the Institute of Biological Science, Federal University of Para (Belem-Brazil). Mice were maintained in polypropylene cages (five mice per cage) under standard and controlled conditions of temperature ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($55 \pm 10\%$). Filtered water and standard pellet diet were given *ad libitum*.

Plasmodium Berghei ANKA Infection

Infection was performed as previously described by Oliveira et al. (2017). *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) strains (Laboratory of Experimental Neuropharmacology, UFPa) were kept as frozen stocks in liquid nitrogen vials. Briefly, all experimental mice were intraperitoneally (i.p.) infected with 1×10^6 PbA-pRBCs suspended in 0.1 ml of phosphate-buffered saline (PBS), obtained from cardiac puncture from homolog mice that had been previously injected with frozen PbA stock solution.

In the course of the disease, mice were observed for parameters as weight loss, survival, blood parasitemia, and ECM clinical signs. Infected and treated animals were assessed daily, and the time of death was promptly registered. Behavioral

changes, such as ataxia and convulsion state, were used as established humane endpoints to reduce animal suffering.

Animal body weights were regularly measured during the course of the disease. Parasitemia levels (percentage of pRBCs) were monitored daily by microscopic counting from Giemsa-stained (Sigma-Aldrich) thin smears obtained from mice tail-vein blood and determined according to the formula [(number of pRBCs)/(total numbers of RBCs counted)] \times 100.

Melatonin Treatment

To evaluate the potential neuroprotective effect of melatonin in ECM, mice were randomly assigned into four distinct groups: uninfected control group, PbA-infected group and PbA-infected and treated with 5 mg/kg melatonin, and PbA-infected and treated with 10 mg/kg melatonin. Melatonin (Sigma-Aldrich) dissolved in 1% DMSO (Sigma-Aldrich, Brazil) solution and saline (0.9%; pH 7.4) was given by intraperitoneal injection once daily at a dose of 5 and 10 mg/kg for four consecutive days post-infection, starting on the day of infection. Mice of the control group and PbA-infected group received (i.p.) 0.9% saline solution daily.

Rapid Murine Coma and Behavior Tests

At day 6 post-infection, the behavioral clinical signs and disease severity was monitored using the grading quantitative Rapid Murine Coma and Behavior scale (RMCBS) described by Carroll et al. (2010). This method was developed to assess the early clinical manifestation of murine CM, and the protocol consists of 10 parameters in which hygiene-related behavior gait, body position, exploratory behavior, and balance were assessed and scored from 0 to 20, in which 0 corresponds to the lowest compromised neurological function and 20 corresponds to severe neurological impairment.

Briefly, in 3 min, the animals were subjected to a video recording for 90 s to assess behavioral parameters such as gait, motor performance, body position, touch escape, pinna reflex, toe pinch, aggression, and grooming. In the next 90 s, mice were assessed for limb strength and balance. Each parameter was scored 0–2 points based on the performance of the infected and treated mice, in which 0 corresponds to severe neurological impairment and 2 corresponds to the lowest compromised neurological function. The total score (0–20) of the domains was calculated by the sum of the parameters for each animal on day of analysis.

Evans Blue Dye Perfusion for Vascular Leakage

BBB disruption was assessed by measuring Evan's blue extravasation as previously described by Kim et al. (2014). Briefly, at day 6 post-infection, mice were intraperitoneally injected with 200 μ l of 1% Evan's blue dye (Sigma-Aldrich) prepared in sterile saline solution. After 2 h, anesthetized mice were perfused with saline and sacrificed. Brains were isolated, weighed, and placed in dimethyl formamide for 48 h at 37°C (in the dark) to extract Evan's blue dye from the brain tissue. The concentration of Evan's Blue dye was measured at 620 nm in a plate reader and calculated using a standard dye curve. Data

were expressed as micrograms of dye extravasated per gram of brain tissue.

Edema

Brain water content as a marker of cerebral edema was determined using the wet/dry method previously described by Ding et al. (2015). At 6 days post-infection, mice were deeply anesthetized and brains were collected and immediately weighted (wet weight) and then dried at 80°C for 72 h (dry weight). The percentage of brain water content was then estimated as [(wet weight – dry weight)/wet weight \times 100%].

Hematoxylin and Eosin Staining and Cell Counting

Mice were first anesthetized with ketamine and xylazine, and the brains of each experimental group were transcardially perfused with PBS and 4% paraformaldehyde. Post-fixed brains were carefully dissected and embedded in paraffin wax. Serial coronal sections into 8 μ m were performed and stained with hematoxylin and eosin (H&E). The brain cortex was examined in the cortical-medullary area under a light microscope and photographed at 20, 40, and 60 \times objective lens. For cell counting, DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole; Sigma) staining was performed as previously described (Chan et al., 2012). In brief, the free-floating sections were washed with PBS and incubated with DAPI solution (1:10,000) for nuclear staining at 37°C for 2 min. To count the cell nucleus, slices were placed in mounting medium (Fluoroshield) and visualized under fluorescence microscopy (**\times 20 objective lens**); (Nikon_EclipseNi). To assure the counting of cells from cerebral parenchyma, areas of cell infiltrate were excluded from DAPI counting. Data were analyzed using ImageJ software.

Open Field Behavior Test

The open field is a common test used to measure mice locomotor and exploratory behavior. The test was performed 6 days post-infection according to the protocol described by Desruisseaux et al. (2008). Briefly, mice were individually placed in the center of the testing chamber (83 \times 52 cm) with black floor to freely explore the arena for 5 min. Data recorded included the number of crossed quadrants, grooming frequency, and lifting frequency. Each animal performed only one trial test. The apparatus was cleaned with 70% alcohol between trials, and tests were carried out under the same standard conditions. The sessions were monitored by a digital camera attached above the apparatus, and later analyses were conducted using the X-Plot-Rat Software.

Statistical Analysis

All data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD). Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by post-test Tukey–Kramer. Survival data were compared and analyzed using log-rank test of Kaplan–Meier curves. Mice were randomly divided into groups of 10 animals (per group), and all data are representative of at least two independent experiments. Analyses were conducted with the GraphPad Prism Software and significant differences were defined with *p* values below 0.05.

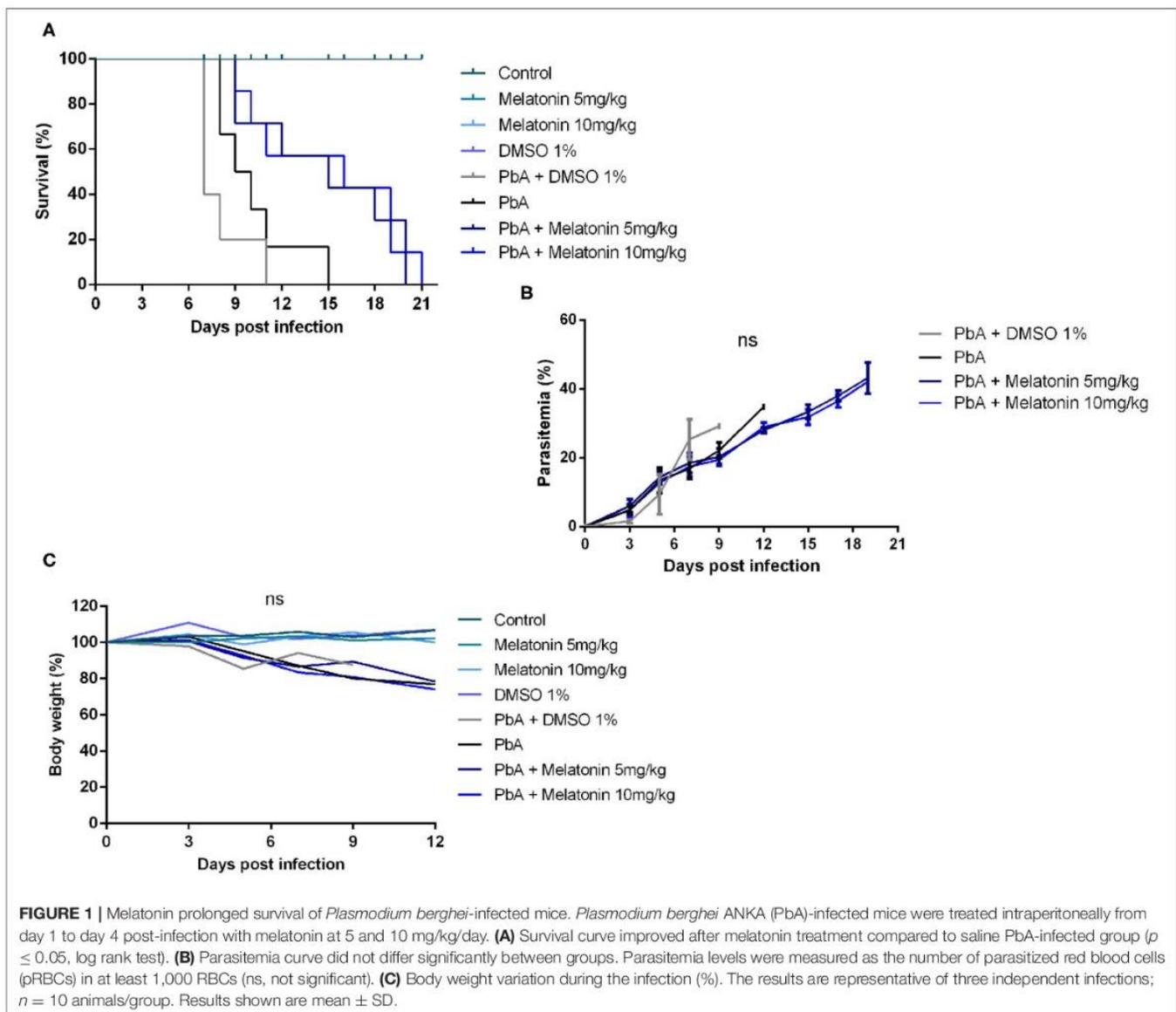
RESULTS

Melatonin Treatment Improves the Survival Rate and Disease Severity in Swiss Mice Infected With PbA

To address the effect of melatonin on the clinical progression of ECM, PbA-infected mice were treated with 5 and 10 mg/kg/day of melatonin for four consecutive days. Consistent with prior observations, PbA-infected mice developed marked neurological symptoms between 6 and 10 days post-infection, characterized by physical inactivity, hemiplegia, and ataxia ending up with convulsions, coma, and death. Eighty percent of PbA-infected mice succumbed to CM on days 8–11 whereas 20% died on day 15 due to severe malaria (Figure 1A). Despite having no anti-parasitic action, melatonin treatment in both doses of 5 and 10 mg/kg significantly prolonged the survival rate of

PbA-infected mice. At 11 days post-infection, the melatonin-treated group exhibited a 57% of survival rate with mice showing no CM neurological symptoms when compared to the PbA-infected group that exhibited a 16% survival rate (Figure 1A). To investigate whether the survival improvement was correlated to changes in peripheral parasite rate, parasitemia was monitored, but no significant difference was registered between groups (Figure 1B). Further, melatonin also had no effect on body weight average in uninfected mice or in PbA-infected mice (Figure 1C).

In the RMCBS protocol, melatonin treatment also reduced disease severity and the development of neurological signs associated to ECM. It was possible to notice that melatonin treatment at both 5 and 10 mg/kg prevented the loss of all functional domains evaluated in the late stage of the disease



(day 6 post-infection) such as coordination, motor performance, muscle tone and strength, reflexes and self-preservation, and hygiene-related behavior (Figure 2).

Melatonin Prevents BBB Disruption and Cerebral Edema Induced by PbA Infection

We next investigated whether brains of melatonin-treated mice showed differences in the stability of the BBB, once its disruption is a crucial event associated with human and experimental CM outcome (de Souza et al., 2009). The effect of melatonin in BBB permeability was evaluated by determining the Evans blue dye concentrations in the mice brain tissue. Figure 3A shows representative images of whole brains in the distinct groups, revealing that melatonin-treated PbA-infected mice had a more discrete staining when compared to the PbA-infected group.

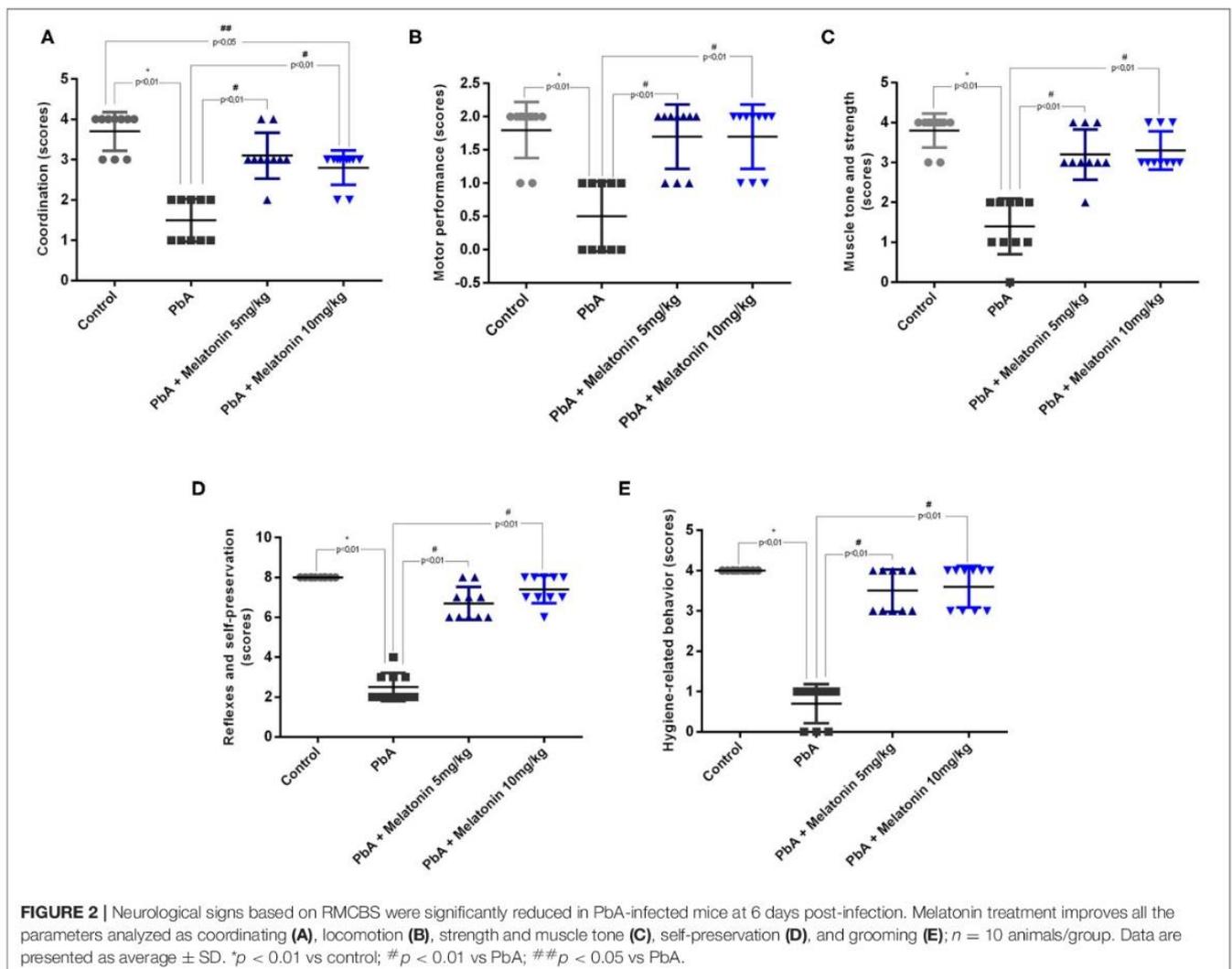
The quantification of formamide extraction revealed that the brains of CM mice had a marked increase in BBB permeability at 6 days post-infection (an average increase of 40% in Evans blue extravasation as compared to uninfected control group—from

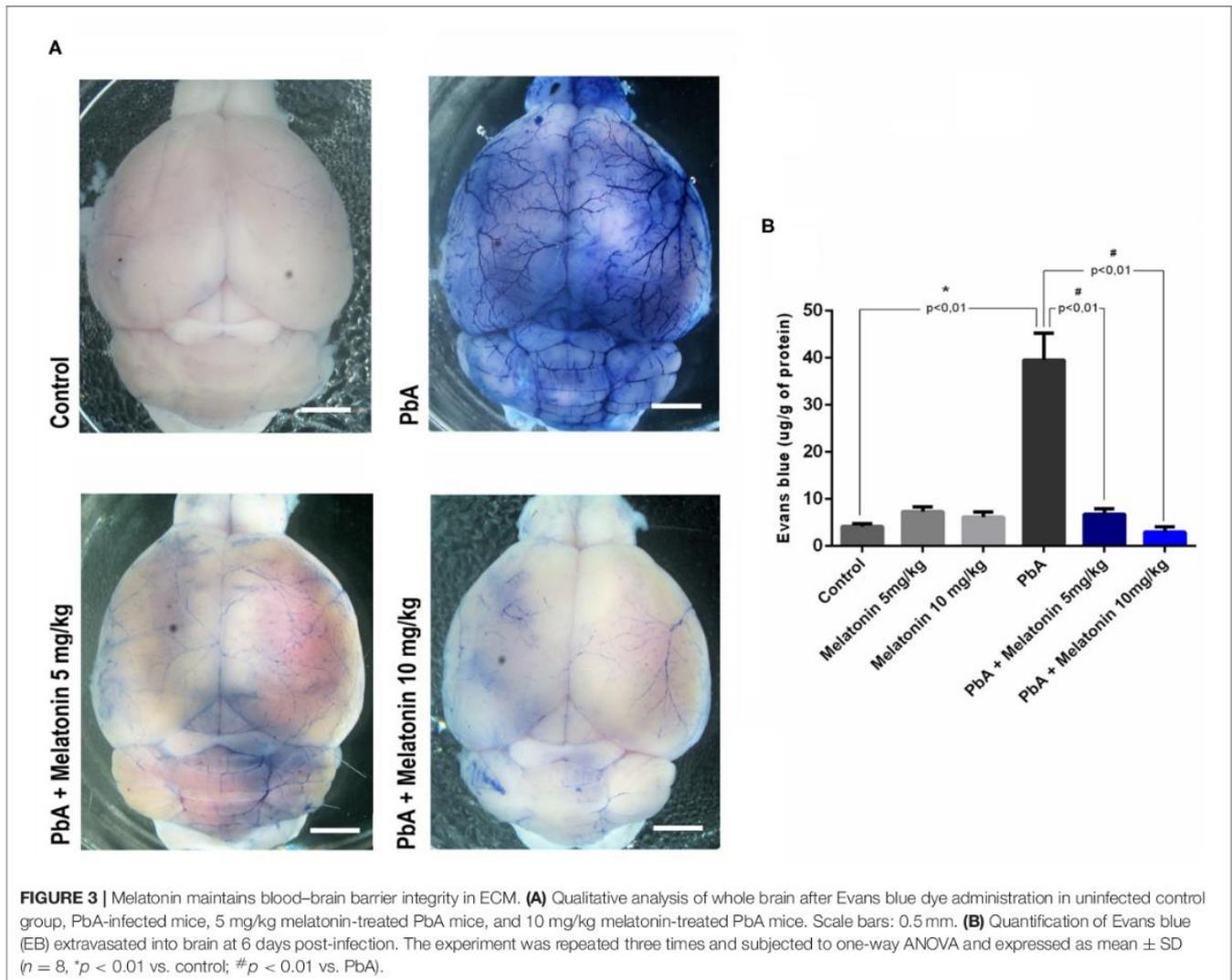
8 $\mu\text{g/g}$ in uninfected control to 40 $\mu\text{g/g}$ in PbA-infected mice) (Figure 3B). In contrast, melatonin-treated PbA-infected mice in both doses of 5 and 10 mg/kg exhibited a dramatically reduced amount of Evans blue extravasated into the brain parenchyma when compared to PbA-infected mice (Figure 3B).

As shown in Figure 4, brain water content was also evaluated at day 6 post-infection as an indicator of brain edema. It was demonstrated that PbA infection significantly increased brain water content when compared to the uninfected mice group. However, melatonin-treated PbA-infected mice had significantly less brain water content than the PbA-infected group. This result indicates that melatonin ameliorates the brain edema induced by PbA infection.

Melatonin Decreases Histological Alterations in PbA-Infected Animals

Histological analysis of brain cortical slices showed a disorganized parenchyma with evident acidophilic nuclear retraction and vacuolation at 6 days post-infection. Cellular





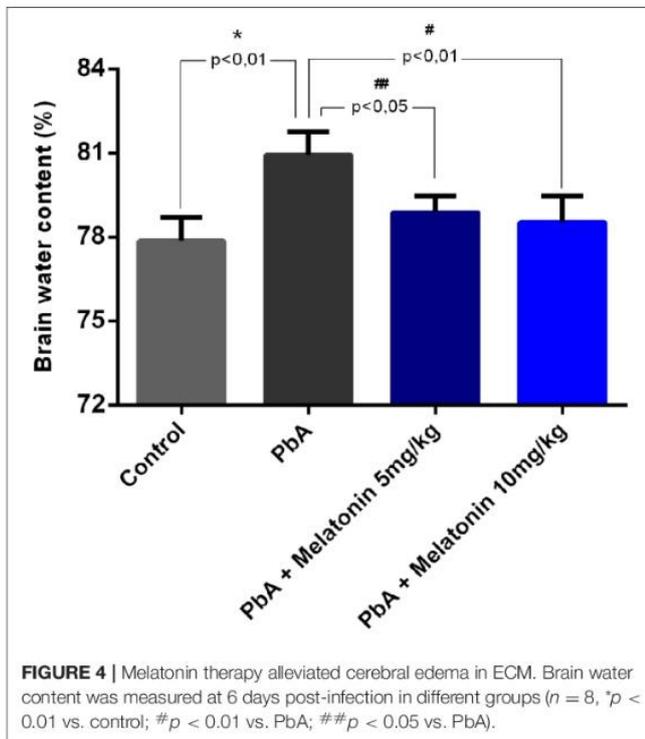
infiltration, vascular dilatation, occluded capillaries, and hemorrhagic areas were also observed and quantified at this stage of the disease (Figures 5B,C). All these pathological changes were ameliorated by the treatment with both melatonin doses (Figures 5A,C). DAPI staining demonstrated that the number of cells was significantly reduced in the cortex of PbA-infected mice at 6 days post-infection. In contrast, the treatment with melatonin at 5 and 10 mg/kg protected the cortical tissue from this cellular loss (Figure 6A), maintaining the number of cells near the control group (Figure 6B). Thus, we demonstrated that melatonin treatment has prevented cell loss in the brain cortex of PbA-infected mice.

Melatonin Treatment Attenuated Motor Behavioral Abnormalities Induced by PbA-Infected Mice

To evaluate the protective effect of melatonin on motor impairment, an open field test was performed in late stage of the disease on day 6 post-infection. On the proposed test,

parameters such as lines crossed, rearing, and grooming behavior were measured in the distinct groups and illustrated in Figure 7. On day 6 post-infection, PbA-infected mice exhibited significant decreased locomotor activity and gait dysfunction by crossing a smaller number of squares as compared to uninfected mice, whereas melatonin-treated mice at different doses (5 and 10 mg/kg) showed a marked improvement in total locomotor activity by the increased number of crossed squares as compared to the PbA-infected mice (Figure 7A). Moreover, the uninfected group treated only with melatonin (5 and 10 mg/kg) showed no significant behavioral alteration compared with the control group, indicating that, in this condition, melatonin did not modulate the excitability of the CNS (Figure 7).

Additional measures of motor impairment such as the number of rearing and self-grooming were also analyzed. Both parameters were also found to be significantly decreased in PbA-infected mice as compared to the uninfected control group, and melatonin elicited significant improvement in these motor indicators



(Figures 7B,C). Taken together, these behavioral results indicate that motor dysfunctions induced by ECM can be prevented by the treatment with melatonin.

DISCUSSION

In addition to being the main autocrine neurohormone released by pineal gland, melatonin has also been reported with anti-inflammatory and antioxidant effects (Tan et al., 2003; Esposito and Cuzzocrea, 2010; Acuña-Castroviejo et al., 2014). Moreover, this neurohormone has been shown to be neuroprotective against CNS injuries by its anti-apoptotic action (Mésenge et al., 1998; Ali and Kim, 2015; Shukla et al., 2019). CM is a devastating disease often responsible for high mortality rates. Clinical studies reveal that most survivors may not fully recover from persistent motor-neurocognitive impairment despite worthy recent advances in available antimalarial drugs (Murphy and Breman, 2001; Carter et al., 2005). Herein we report, for the first time, that melatonin treatment is able to ameliorate clinical signs and neurocognitive dysfunctions in PbA-infected mice, resulting in protection from ECM outcome. Murine experimental CM is characterized by BBB breakdown, brain edema, and parenchyma lesions, which lead to damage within the CNS (Bagot et al., 2002; Martins et al., 2009a). The outcome of CM is established during the acute phase of the PbA-infection when parasitemia reaches rates between 10 and 15%. At this stage, mice display characteristic clinical signs such as paralysis of the limbs, poor reflex, deviation of head, spontaneous rolling over, convulsions, and coma (Ampawong et al., 2014). In addition, while PbA-infected animals

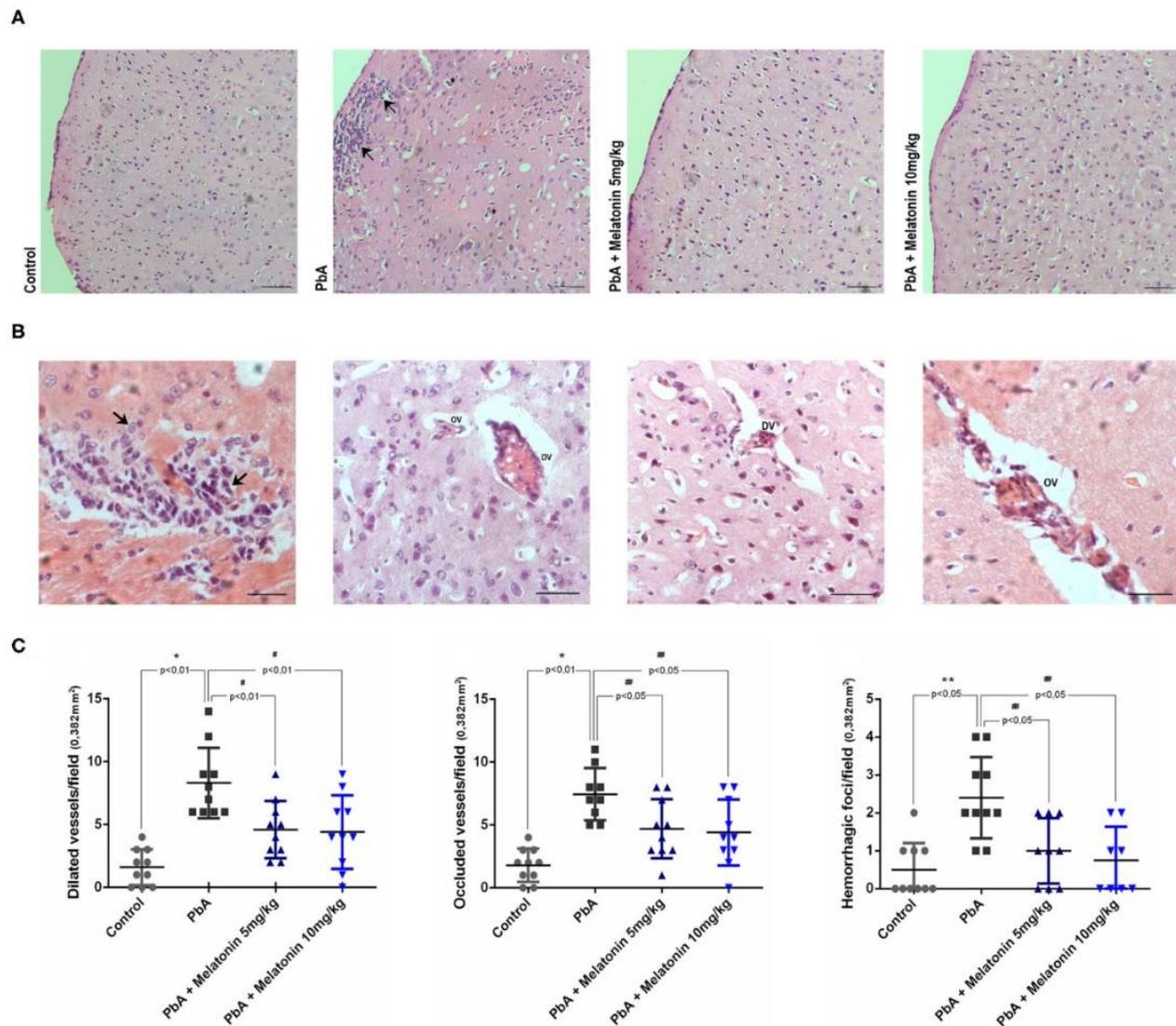
presented neurological symptoms and die between days 8 and 11 post-infection, melatonin-treated mice exhibited enhanced survival from acute infection, and most of them died between 15 and 21 days post-infection with no signs of neurological dysfunction. Our results suggested that melatonin suppresses CM development, and considering that animals showed elevated levels of parasitemia in the end stage of the disease (as described in Figure 1B), melatonin-treated animals probably died of severe anemia as previously described in anterior reports (Dende et al., 2015). All of these protective effects elicited by melatonin treatment were not associated with reduction of parasitemia levels and body weight, suggesting that melatonin has exerted its protective effect mainly on the CNS of infected mice.

The fact that melatonin did not alter the parasitemia at any stage of the disease could be explained by the fact that in *P. berghei* infection, the life cycle of the parasite is not influenced by the melatonin levels developing an asynchronous pattern of infection. Bagnaesi et al. (2009) demonstrated that the inhibition of melatonin receptor and the treatment with melatonin did not modify the parasite load in the livers of mice infected with *PbA* sporozoites.

There is a sturdy connection between the breakdown of the BBB and CM pathogenesis in both human and mouse experimental models (Lou et al., 2001; Medana and Turner, 2006; Dunst et al., 2017). Moreover, cerebral edema resulting from enhanced BBB breakdown is also a notorious feature of HCM and ECM (Thumwood et al., 1988; Penet et al., 2005). Although parasitemia levels were relatively high in melatonin-treated PbA-infected mice, there was a relevant reduction in BBB leakage and brain edema after melatonin treatment on day 6 post infection. Additionally, melatonin treatment also attenuates brain histological damages induced by PbA infection. Although our data demonstrated that the treatment with melatonin reduces the disarrangement in the brain cortex with typical and suggestive areas of leukocyte infiltration, additional studies using CD45 and CD8⁺ T cell staining need to be performed to better characterize this effect. This provides evidence that melatonin treatment could effectively reduce brain neuroinflammation associated with ECM pathology even in the presence of elevated parasitemia levels.

Furthermore, melatonin is an amphipathic molecule, which makes it suitable to cross not only BBB but also several other cellular compartments such as endoplasmic reticulum, mitochondria, and nucleus (Guha et al., 2007; Cardinali et al., 2013; Ding et al., 2015). The mechanisms through which melatonin protects BBB breakdown and subsequent brain edema during CM onset might be associated with the regulation of adhesion proteins in cerebrovascular endothelial cells, although additional studies need to be done to confirm our hypothesis.

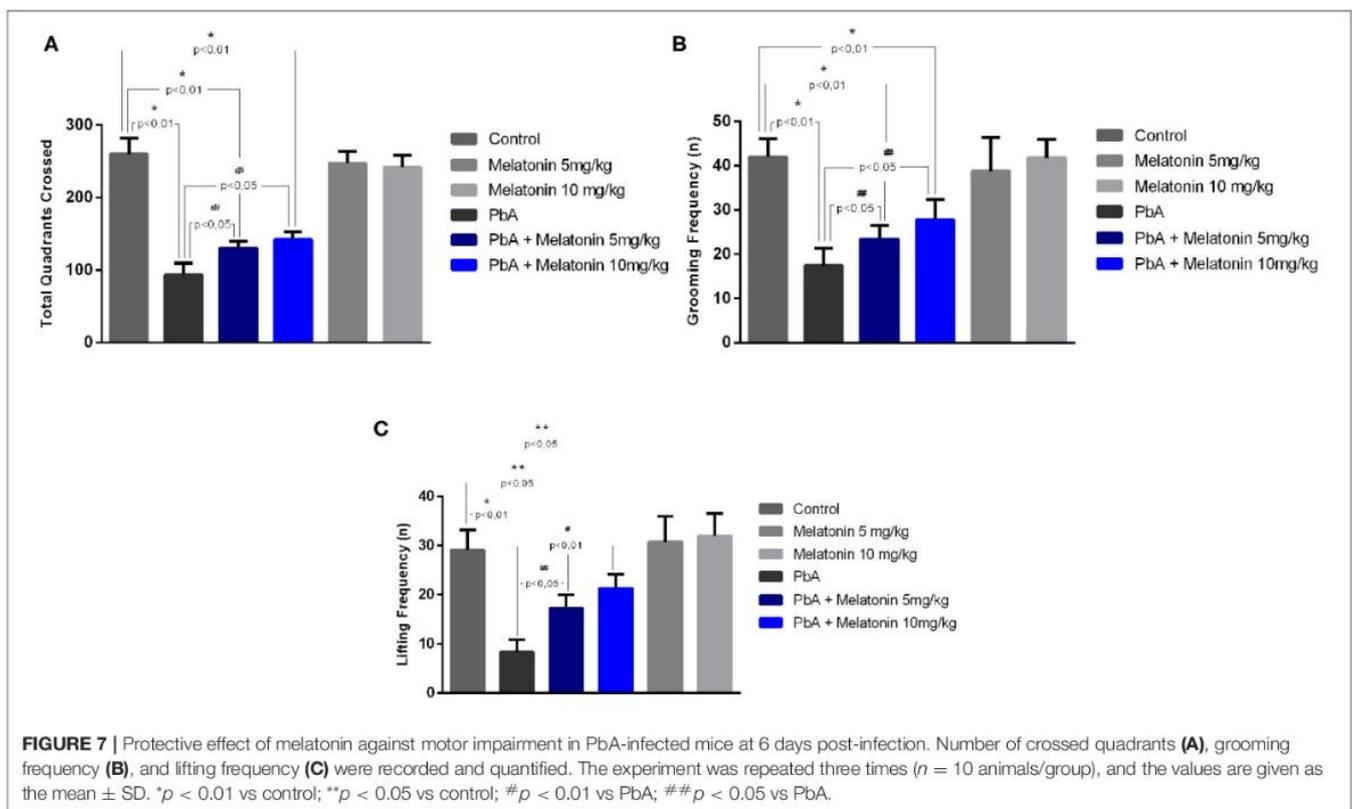
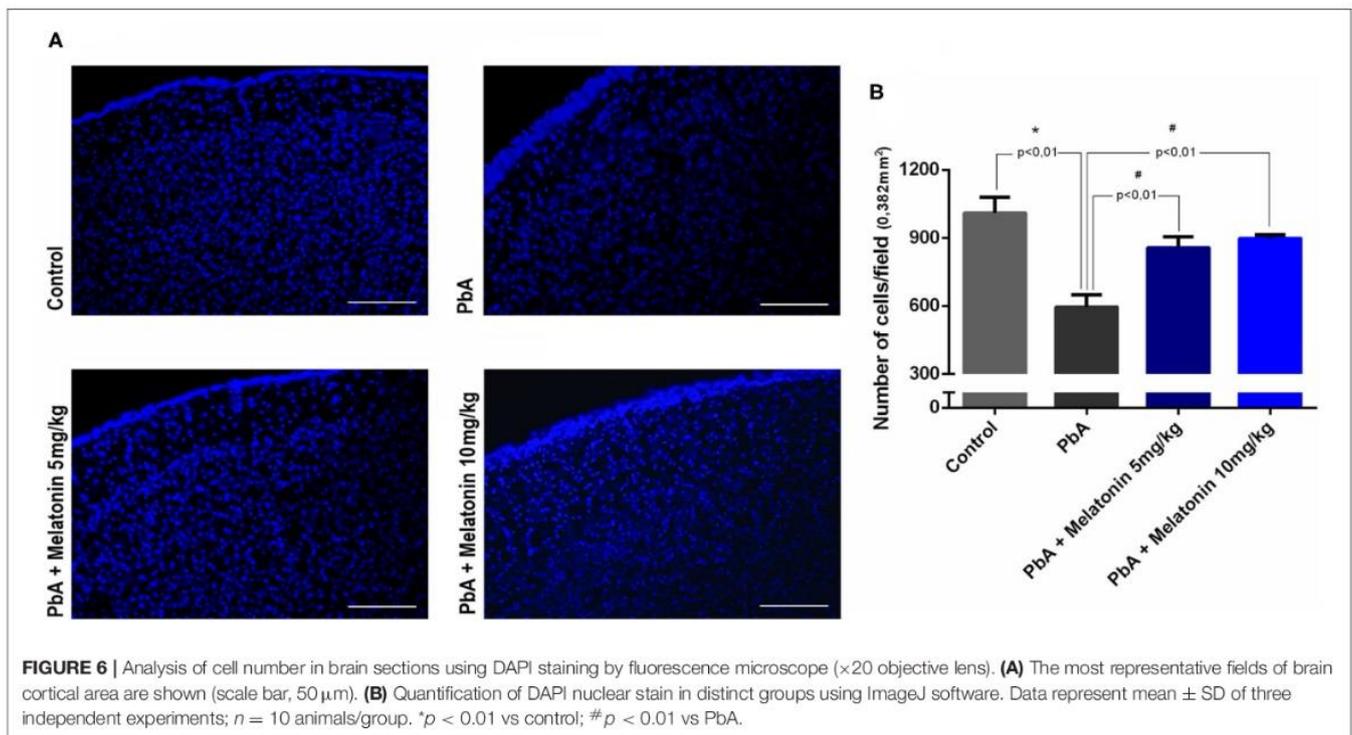
We cannot exclude the fact that melatonin neuroprotection could be associated with its antioxidant effect once previous studies have already demonstrated that daily administration of melatonin restores antioxidant capacity and inhibit the production of pro-inflammatory cytokines in an experimental model of diabetic retinopathy (Negi et al., 2011). In addition, melatonin is able to decrease the expression of NADPH oxidase isoforms Nox2 and Nox4, reduces reactive oxygen species



generation, and inhibits apoptotic cell death in a rat model of cerebral ischemia (Li et al., 2014).

In mouse models of newborn hypoxic-ischemic brain injury, melatonin exerts a neuroprotective role by the activation of M1 melatonin receptors, inhibition of mitochondrial cell death pathways, and astrocytic activation. Moreover, studies demonstrated that melatonin could potentially attenuate reactive gliosis and reduces microglial activation, which are remarkable and well-characterized events in CM pathogenesis (Cervantes et al., 2008; Sinha et al., 2017).

Besides, we also observed that melatonin treatment protected CM mice from long-term neurocognitive and motor impairment such as gait and motor dysfunction. The open field test is a useful method to measure poor gait and ambulation in rodent models of CM, and in the present study, PbA-infected mice that received melatonin performed as well as uninfected control mice. According to our behavioral analysis, melatonin significantly improved motor impairment in PbA-infected mice. A previous report has already described that chronic melatonin therapy attenuated D-galactose-induced memory and neuronal



impairment by decreasing neurodegeneration through the activation of RAGE/NF- κ B and JNK signaling pathways (Ali et al., 2015).

Interestingly, a study also demonstrated that the deficiency of endogenous melatonin exacerbates the neuronal damage in traumatic brain injury patients, providing notable evidence of

the exogenous administration efficacy. In agreement with our study, exogenous administration of melatonin by intraperitoneal injection decreases brain edema and infarct volume and ameliorates neurological deficits in mice brain injury in a single or repeated dose of 10 mg/kg (Reiter et al., 2003). Due to its functional diversity, exogenous melatonin has been investigated as a compatible candidate for the treatment of distinct disorders such as neuroinflammatory conditions and neurodegenerative diseases, but no studies have described the neuroprotective action of melatonin on the brain dysfunction induced by severe malaria (Samantaray et al., 2003; Singhal et al., 2012; Rosales-Corral et al., 2017; Su et al., 2017; Shukla et al., 2019).

In summary, our results in an experimental model of CM suggest that melatonin treatment may improve survival and BBB integrity and prevent neuromotor impairment in mice infected with PbA, without altering parasitemia levels. Moreover, the exact mechanism by which melatonin exerts its neuroprotective effect should be further investigated.

CONCLUSIONS

In conclusion, the present study demonstrates for the first time the neuroprotective role of melatonin against BBB breakdown and behavior impairment evoked by CM. In this way, the current data represent an important further pre-clinical evidence that melatonin could be an efficient adjuvant for CM treatment.

REFERENCES

- Acuña-Castroviejo, D., Escames, G., Venegas, C., Díaz-Casado, M. E., Lima-Cabello, E., López, L. C., et al. (2014). Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell Mol. Life Sci.* 71, 2997–3025. doi: 10.1007/s00018-014-1579-2
- Ali, T., Badshah, H., Kim, T. H., and Kim, M. O. (2015). Melatonin attenuates D-galactose-induced memory impairment, neuroinflammation and neurodegeneration via RAGE/NF- κ B/JNK signaling pathway in aging mouse model. *J. Pineal Res.* 58, 71–85. doi: 10.1111/jpi.12194
- Ali, T., and Kim, M. O. (2015). Melatonin ameliorates amyloid beta-induced memory deficits, tau hyperphosphorylation and neurodegeneration via PI3/Akt/GSK3 β pathway in the mouse hippocampus. *J. Pineal Res.* 59, 47–59. doi: 10.1111/jpi.12238
- Ampawong, S., Chaisri, U., Viriyavejakul, P., Nontprasert, A., Grau, G. E., Pongponratn, E. (2014). Electron microscopic features of brain edema in rodent cerebral malaria in relation to glial fibrillary acidic protein expression. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7, 2056–2067.
- Bagnaresi, P., Alves, E., Da Silva, H. B., Epiphanyo, S., Mota, M. M., and Garcia, C. R. (2009). Unlike the synchronous *Plasmodium falciparum* and *P. chabaudi* infection, the *P. berghei* and *P. yoelii* asynchronous infections are not affected by melatonin. *Int. J. Gen Med.* 2, 47–55. doi: 10.2147/IJGM.s3699
- Bagot, S., Idrissa Boubou, M., Campino, S., Behrschmidt, C., Gorgette, O., Guénet, J. L., et al. (2002). Susceptibility to experimental cerebral malaria induced by *Plasmodium berghei* ANKA in inbred mouse strains recently derived from wild stock. *Infect. Immun.* 70, 2049–2056. doi: 10.1128/IAI.70.4.2049-2056.2002
- Bavithra, S., Selvakumar, K., Sundareswaran, L., and Arunakaran, J. (2017). Neuroprotective effect of melatonin against PCBs induces behavioral molecular and histological changes in cerebral cortex of adult male wistar rats. *Neurochem Res.* 42:428. doi: 10.1007/s11064-016-2087-6
- Beraldo, F. H., Almeida, F. M., da Silva, A. M., and Garcia, C. R. (2005). Cyclic AMP and calcium interplay as second messengers in melatonin-dependent regulation of *Plasmodium falciparum* cell cycle. *J. Cell Biol.* 170, 551–557. doi: 10.1083/jcb.200505117
- Brazão, V., Colato, R. P., Santello, F. H., Filipin Mdel, V., Toldo, M. P., do Vale, G. T., et al. (2015). Interleukin-17, oxidative stress, and inflammation: role of melatonin during trypanosoma cruzi infection. *J. Pineal Res.* 59, 488–496. doi: 10.1111/jpi.12280
- Budu, A., Peres, R., Bueno, V. B., Catalani, L. H., and Garcia, C. R. D. (2007). S.N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine modulates the cell cycle of malaria parasites. *J. Pineal Res.* 42, 261–266. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00414.x
- Cardinali, D. P., Pagano, E. S., Scacchi Bernasconi, P. A., Reynoso, R., Scacchi, P. (2013). Melatonin and mitochondrial dysfunction in the central nervous system. *Horm Behav.* 63, 322–330. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.02.020
- Carroll, R. W., Wainwright, M. S., Kim, K. Y., Kidambi, T., Gómez, N. D., Taylor, T., et al. (2010). A rapid murine coma and behavior scale for quantitative assessment of murine cerebral malaria. *PLoS ONE.* 5:13124. doi: 10.1371/journal.pone.0013124
- Carter, J. A., Ross, A. J., Neville, B. G., Obiero, E., Katana, K., Mung'ala-Odera, V., et al. (2005). Developmental impairments following severe falciparum malaria in children. *Trop. Med. Int. Health.* 1, 3–10. doi: 10.1111/j.1365-3156.2004.01345.x
- Cervantes, M., Moralí G., Letechipia-Vallejo, G. (2008). Melatonin and ischemia-reperfusion injury of the brain. *J. Pineal Res.* 45, 1–7. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00551.x
- Chan, L. L., Wilkinson, A. R., Paradis, B. D., and Lai, N. (2012). Rapid image-based cytometry for comparison of fluorescent viability staining methods. *J. Fluoresc.* 22, 1301–1311. doi: 10.1007/s10895-012-1072-y
- Chang, C. C., Tien, C. H., Lee, E. J., Juan, W. S., Chen, Y. H., Hung, Y. C., et al. (2012). Melatonin inhibits matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activation in the lipopolysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 and

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation, to any qualified researcher.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Animal Ethics Committee of the Federal University of Para (Protocol number: 6211241117/UFPA).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

BA performed and acquired all the experimental data. NK performed the histological analyses. MT and LA performed and analyzed the behavioral data. NM performed the extravasation dye method. AP revised the manuscript and statistical analysis. SM contributed to the final drafting of the article. EB provided technical and material support. AH analyzed and interpreted the data. KO conceived, designed, and supervised the study.

FUNDING

This work was supported by grants from Pro-Amazônia (CAPES), CNPq, and FAPESPA, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq 311203/2017-5/FAPESPA 005/2016.

- BV2 cells and a mouse model of meningitis. *J. Pineal Res.* 53, 188–197. doi: 10.1111/j.1600-079X.2012.00986.x
- Combes, V., De Souza, J. B., Rénia, L., Hunt, N. H., and Grau, G. E. (2005). Cerebral malaria: which parasite? Which model? *Drug Discov. Today Dis. Models.* 2, 141–147. doi: 10.1016/j.ddmod.2005.05.015
- Dai, M., Reznik, S. E., Spray, D. C., Weiss, L. M., Tanowitz, H. B., Gulino, M., et al. (2010). Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microbes Infect.* 12, 1198–1207. doi: 10.1016/j.micinf.2010.08.006
- Daryani, A., Montazeri, M., Pagheh, A. S., Sharif, M., Sarvi, S., Hosseinzadeh, A., et al. (2018). The potential use of melatonin to treat protozoan parasitic infections: a review. *Biomed Pharmacother.* 97, 948–957. doi: 10.1016/j.biopha.2017.11.007
- de Souza, J. B., Hafalla, J. C., Riley, E. M., and Couper, K. N. (2009). Cerebral malaria: why experimental murine models are required to understand the pathogenesis of disease. *Parasitology* 137, 755–772. doi: 10.1017/S0031182009991715
- Dende, C., Meena, J., Nagarajan, P., Panda, A. K., Rangarajan, P. N., Padmanaban, G. (2015). Simultaneously targeting inflammatory response and parasite sequestration in brain to treat experimental cerebral malaria. *Sci Rep.* 5:12671. doi: 10.1038/srep12671
- Desruisseaux, M. S., Gulino, M., Smith, D. N., Lee, S. C., Tsuji, M., Weiss, L. M., et al. (2008). Cognitive dysfunction in mice infected with *Plasmodium berghei* strain ANKA. *J. Infect. Dis.* 197, 1621–1627. doi: 10.1086/587908
- Ding, K., Xu, J., Wang, H., Zhang, L., Wu, Y., and Li, T. (2015). Melatonin protects the brain from apoptosis by enhancement of autophagy after traumatic brain injury in mice. *Neurochem Int.* 91, 46–54. doi: 10.1016/j.neuint.2015.10.008
- Dunst, J., Kamena, F., Matuschewski, K. (2017). Cytokines and chemokines in cerebral malaria pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 7:324. doi: 10.3389/fcimb.2017.00324
- Esposito, E., and Cuzzocrea, S. (2010). Antiinflammatory activity of melatonin in central nervous system. *Curr. Neuropharmacol.* 8, 228–242. doi: 10.2174/157015910792246155
- Fischer, T. W., Kleszczynski, K., Hardkop, L. H., Kruse, N., and Zillikens, D. (2013). Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J. Pineal Res.* 54, 303–312. doi: 10.1111/jpi.12018
- Guha, M., Maity, P., Choubey, V., Mitra, K., Reiter, R. J., Bandyopadhyay, U. (2007). Melatonin inhibits free radical-mediated mitochondrial-dependent hepatocyte apoptosis and liver damage induced during malarial infection. *J. Pineal Res.* 43, 372–381. doi: 10.1111/j.1600-079X.2007.00488.x
- He, P., Ouyang, X., Zhou, S., Yin, W., Tang, C., Laudon, M., et al. (2013). A novel melatonin agonist Neu-P11 facilitates memory performance and improves cognitive impairment in a rat model of Alzheimer' disease. *Horm Behav.* 64, 1–7. doi: 10.1016/j.yhbeh.2013.04.009
- Hunt, N. H., Golenser, J., Chan-Ling, T., Parekh, S., Rae, C., Potter, S., et al. (2006). Immunopathogenesis of Cerebral Malaria. 36, 569–582. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.02.016
- Hunt, N. H., and Grau, G. E. (2003). Cytokines: accelerators and brakes in the pathogenesis of cerebral malaria. *Trends Immunol.* 24, 491–499. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00229-1
- Idro, R., Jenkins, N. E., and Newton, C. R. (2005). Pathogenesis, clinical features, and neurological outcome of cerebral malaria. *Lancet Neurol.* 4, 827–840. doi: 10.1016/S1474-4422(05)70247-7
- Jimenez-Jorge, S., Guerrero, J. M., Jimenez-Caliani, A. J., Naranjo, M. C., Lardone, P. J., Carrillo-Vico, A., et al. (2007). Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *J. Pineal Res.* 42, 240–246. doi: 10.1111/j.1600-079X.2006.00411.x
- John, C. C., Bangirana, P., Byarugaba, J., Opoka, R. O., Idro, R., Jurek, A. M., et al. (2008). Cerebral malaria in children is associated with long-term cognitive impairment. *Pediatrics* 122, 92–99. doi: 10.1542/peds.2007-3709
- Kim, H., Erdman, L. K., Lu, Z., Serghides, L., Zhong, K., Dhabangi, A., et al. (2014). Functional roles for C5a and C5aR but no C5L2 in the pathogenesis of human and experimental cerebral malaria. *Infect Immun.* 82, 371–379. doi: 10.1128/IAI.01246-13
- Li, H., Wang, Y., Feng, D., Liu, Y., Xu, M., Gao, A., et al. (2014). Alterations in the time course of expression of the Nox family in the brain in a rat experimental cerebral ischemia and reperfusion model: effects of melatonin. *J. Pineal Res.* 57, 110–119. doi: 10.1111/jpi.12148
- Lou, J., Lucas, R., Grau, G. E. (2001). Pathogenesis of cerebral malaria: recent experimental data and possible applications for humans. *Clin. Microbiol. Rev.* 14, 810–820. doi: 10.1128/CMR.14.4.810-820.2001
- Luthra, T., Nayak, A. K., Bose, S., Chakrabarti, S., Gupta, A., and Sen, S. (2019). Indole based antimalarial compounds targeting the melatonin pathway: their design, synthesis and biological evaluation. *Eur. J. Med. Chem.* 168, 11–27. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.02.019
- Martins, Y. C., Carvalho, L. J., and Daniel-Ribeiro, C. (2009a). Challenges in the determination of early predictors of cerebral malaria: Lessons from the human disease and the experimental murine models. *Neuroimmunomodulation* 16, 134–145. doi: 10.1159/000180268
- Martins, Y. C., Smith, M. J., Pelajo-Machado, M., Werneck, G. L., Lenzi, H. L., Daniel-Ribeiro, C. T., et al. (2009b). Characterization of cerebral malaria in the outbred swiss webster mouse infected by *Plasmodium berghei* ANKA. *Int. J. Exp. Pathol.* 90, 119–130. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00622.x
- Medana, I. M., and Turner, G. D. (2006). Human cerebral malaria and the blood-brain barrier. *Int. J. Parasitol.* 36, 555–568. doi: 10.1016/j.ijpara.2006.02.004
- Mésenge, C., Margail, I., Verrecchia, C., Allix, M., Boulu, R. G., and Plotkine, M. (1998). Protective effect of melatonin in a model of traumatic brain injury in mice. *J. Pineal Res.* 25, 41–46. doi: 10.1111/j.1600-079X.1998.tb00384.x
- Murphy, S. C., and Breman, J. G. (2001). Gaps in the childhood malaria burden in Africa: cerebral malaria, neurological sequelae, anemia, respiratory distress, hypoglycemia, and complications of pregnancy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 64, 57–67. doi: 10.4269/ajtmh.2001.64.57
- Negi, G., Kumar, A., and Sharma, S. S. (2011). Melatonin modulates neuroinflammation and oxidative stress in experimental diabetic neuropathy: effects on NF-kappaB and Nrf2 cascades. *J. Pineal Res.* 50, 124–131. doi: 10.1111/j.1600-079X.2010.00821.x
- Oliveira, K. R. H. M., Kauffmann, N., Leão, L. K. R., Passos, A. C. F., Rocha, F. A. F., Herculano, A. M., et al. (2017). Cerebral malaria induces electrophysiological and neurochemical impairment in mice retinal tissue: possible effect on glutathione and glutamatergic system. *Malar J.* 16:440. doi: 10.1186/s12936-017-2083-6
- Penet, M. F., Viola, A., Confort-Gouny, S., Le Fur, Y., Duhamel, G., Kober, F., et al. (2005). Imaging experimental cerebral malaria in vivo: significant role of ischemic brain edema. *J. Neurosci.* 25, 7352–7358. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1002-05.2005
- Radogna, F., Diederich, M., and Ghibelli, L. (2010). Melatonin: a pleiotropic molecule regulating inflammation. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1844–1852. doi: 10.1016/j.bcp.2010.07.041
- Reiter, R. J., Sainz, R. M., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Manchester, L. C., and Tan, D. X. (2003). Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental models of stroke. *Ann N. Y. Acad. Sci.* (2003) 993, 35–47. doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07509.x
- Rénia, L., Howland, S. W., Claser, C., Charlotte-Gruner, A., Suwanarus, R., Hui-Teo, T., et al. (2012). Cerebral malaria: mysteries at the blood-brain barrier. *Virulence* 3, 193–201. doi: 10.4161/viru.19013
- Rodriguez, C., Mayo, J. C., Sainz, R. M., Antolin, I., Herrera, F., Martín, V., et al. (2004). Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res.* 36, 1–9. doi: 10.1046/j.1600-079X.2003.00092.x
- Rosales-Corral, S. A., Acuña-Castroviejo, D., Coto-Montes, A., Boga, J. A., Manchester, L. C., Fuentes-Broto, L., et al. (2017). Alzheimer's disease: pathological mechanisms and the beneficial role of melatonin. *J. Pineal Res.* 52, 167–202. doi: 10.1111/j.1600-079X.2011.00937.x
- Rudnitskaya, E. A., Muraleva, N. A., Maksimova, K. Y., Kiseleva, E., Kolosova, N. G., and Stefanova, N. A. (2015). Melatonin attenuates memory impairment, amyloid- β accumulation, and neurodegeneration in a rat model of sporadic alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 47, 103–116. doi: 10.3233/JAD-150161
- Samantaray, S., Das, A., Thakore, N. P., Matzelle, D. D., Reiter, R. J., Ray, S. K., et al. (2003). Therapeutic potential of melatonin in traumatic central nervous system injury. *J. Pineal Res.* 47, 134–142. doi: 10.1111/j.1600-079X.2009.00703.x
- Schuck, D. C., Jordão, A. K., Nakabashi, M., Cunha, A. C., Ferreira, V. F., and Garcia, C. R. (2014). Synthetic indole and melatonin derivatives exhibit antimalarial activity on the cell cycle of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Eur. J. Med. Chem.* 78, 375–382. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.03.055

- Shukla, M., Chinchalongporn, V., Govitrapong, P., and Reiter, R. J. (2019). The role of melatonin in targeting cell signaling pathways in neurodegeneration. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1443, 75–96. doi: 10.1111/nyas.14005
- Singhal, N. K., Srivastava, G., Agrawal, S., Jain, S. K., and Singh, M. P. (2012). Melatonin as a neuroprotective agent in the rodent models of Parkinson's disease: is it all set to irrefutable clinical translation?. *Mol. Neurobiol.* 45, 186–199. doi: 10.1007/s12035-011-8225-x
- Sinha, B., Wu, Q., Li, W., Tu, Y., Sirianni, A. C., Chen, Y., et al. (2017). Protection of melatonin in experimental models of newborn hypoxic-ischemic brain injury through MT1 receptor. *J. Pineal. Res.* 64:e12443. doi: 10.1111/jpi.12443
- Su, S. C., Hsieh, M. J., Yang, W. E., Chung, W. H., Reiter, R. J., and Yang, S. F. (2017). Cancer metastasis: mechanisms of inhibition by melatonin. *J. Pineal Res.* 62:e12370. doi: 10.1111/jpi.12370
- Tan, D. X., Manchester, L. C., Hardeland, R., Lopez-Burillo, S., Mayo, J. C., Sainz, R. M., et al. (2003). Melatonin: a hormone, a tissue factor, an autocoid, a paracoid, and an antioxidant vitamin. *J. Pineal Res.* 34, 75–78. doi: 10.1034/j.1600-079X.2003.02111.x
- Thumwood, C. M., Hunt, N. H., Clark, I. A., and Cowden, W. B. (1988). Breakdown of the blood-brain barrier in murine cerebral malaria. *Parasitology* 96, 579–589. doi: 10.1017/S0031182000080203
- Wang, X., Sirianni, A., Pei, Z., Cormier, K., Smith, K., Jiang, J., et al. (2011). The melatonin MT1 receptor axis modulates mutant Huntingtin-mediated toxicity. *J. Neurosci.* 31, 14496–14507. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3059-11.2011
- WHO (2000). *World Malaria Report*. World Health Organization.
- WHO (2017). *World Malaria Report*. World Health Organization.
- Zhang, H. M., and Zhang, Y. (2014). Melatonin: a well-documented antioxidant with conditional pro-oxidant actions. *J. Pineal. Res.* 57, 131–146. doi: 10.1111/jpi.12162

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Ataide, Kauffmann, Mendes, Torres, dos Anjos, Passos, de Moraes, Batista, Herculano and Oliveira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.