

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto De Ciências Biológicas Bioquímica e Imunologia**  
**Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia**

Paulo Gaio Leite

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM AMIDO-CUMARINA (M220) NO  
DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE E PATOGÊNESE DURANTE A  
MALÁRIA EXPERIMENTAL GRAVE**

Belo Horizonte  
2023

Paulo Gaio Leite

**EFEITOS DO TRATAMENTO COM AMIDO-CUMARINA (M220) NO  
DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE E PATOGÊNESE DURANTE A  
MALÁRIA EXPERIMENTAL GRAVE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiana Simão Machado

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria João Correia Pinto Carvalho de Matos

Belo Horizonte  
2023

043

Leite, Paulo Gaio.

Efeitos do tratamento com amido-cumarina (M220) no desenvolvimento da resposta imune e patogênese durante a malária experimental grave [manuscrito] / Paulo Gaio Leite. – 2023.

125 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Fabiana Simão Machado. Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria João Correia Pinto Carvalho de Matos.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica e imunologia. 2. Plasmodium berghei. 3. Malária Cerebral. 4. Síndrome do Desconforto Respiratório do Adulto. 5. Cumarínicos. I. Machado, Fabiana Simão. II. Matos, Maria João Correia Pinto Carvalho de. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais  
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG  
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha  
 31270-901 – Belo Horizonte – MG  
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE PAULO GAIO LEITE.** Aos doze dias do mês de julho de 2023 às 13:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Efeitos do tratamento com amido-cumarina (M220) no desenvolvimento da resposta imune e patogênese durante a malária experimental grave ", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Imunologia. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profª. Fabiana Simão Machado, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Eugenio Uriarte Villares (Universidad Autónoma de Chile), aprovado; Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni (Universidade Estadual de Londrina), aprovado; Dra. Érika Martins Braga (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dr. Flávio Almeida Amaral (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado; Dra. Maria João C. Pinto Carvalho de Matos - Coorientadora (Universidade do Porto), aprovado; Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovado. Pelas indicações o candidato foi considerado:

APROVADO  
 REPROVADO

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 12 de julho de 2023.

Dr. Eugenio Uriarte Villares (Universidad Autónoma de Chile)

Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni (Universidade Estadual de Londrina)

Dra. Érika Martins Braga (UFMG)

Dr. Flávio Almeida Amaral (UFMG)

Dra. Maria João C. Pinto Carvalho de Matos - Coorientadora (Universidade do Porto)

Dra. Fabiana Simão Machado - Orientadora (UFMG)

Profa. Fabiola Mara Ribeiro  
 Coordenadora do Programa de Pós-graduaçã  
 Em Bioquímica e Imunologia

Para a minha família.

## **Agradecimentos**

Agradeço a Deus em suas múltiplas formas, assim como a todas as energias que caminham comigo, por colocarem meus pés, um à frente do outro para que eu percorresse o caminho.

Sou grato aos meus pais, Paulo Eustáquio e Eliete, meus irmãos (Demétrio e Dâmaris) e seus cônjuges (Lorena e Neilton), bem como aos meus sobrinhos (Mateus e Maria Alice).

Agradeço à minha saudosa Orientadora Fabiana Simão Machado. Obrigado por todos os ensinamentos e conselhos. Você modificou significativamente ( $p < 0,05$ ) a minha vida. Lembrarei-me para sempre.

À minha Co-orientadora Maria João, agradeço a confiança de trabalharmos em conjunto, pela atenção sempre em pronta resposta e carinho em todas as nossas correspondências.

A todos os amigos e colegas de trabalho do Laboratório de Imunorregulação de Doenças Infecciosas (LIDIN): Allysson, Diego Rodney, Renata Monti, Pollyana Pimentel, Bruno Cabal, Melisa Gualdrón, Katherinne Manrique, Fátima Brant, Lisia Esper, Andreia Barroso, Lorryne, Ana Carolina, Ronan Ricardo, Rayane, Rafaela, Samuel Porto, Ana Luisa, Cesar, Fernanda, Mariana Rates, Nathalia Melo, Maycon Douglas, Vivian Alvarenga, Fernando Bento, Isabela Constantino, Laura Lis, Livia Santana, Luiza Pinheiro, Maria Clara, Mayara Ricci e Tiffany. Lembrarei de cada um por suas muitas participações em experimentos, ensinamentos, risadas, irritações e companhias.

Jacqueline, figura indispensável e inesquecível do laboratório LIDIN. Longa medida à nossa querida Jacque.

Ao grupo do Imunofar e seus integrantes: professores, alunos, amigos e técnicos (um agradecimento especial a Frank).

Aos funcionários técnico-administrativos e funcionários da secretaria da pós-graduação (Elimar, Ilma, Ilda, Hermes, Jamil, Alexandre e Orlando - que Deus o tenha em bom lugar). Nunca devemos nos esquecer dos que estão 'por detrás das cortinas'. Nada seria feito sem eles.

Minha querida e admirada professora de graduação, Symone Fulgencio Lima, quem primeiro me ensinou e instigou minha vontade de conhecer mais sobre imunologia.

Digno de nota, meu agradecimento a Fernanda, Eliza e Josiane do CDMA.

Minha esposa Rena, que “de tudo, ao meu amor serei atento. Antes, e com tal zelo, e sempre, e tanto. Que mesmo em face do maior encanto, dele se encante mais meu pensamento”. Obrigado pela paciência durante essa jornada maluca que é o doutorado. E, sem dúvida, obrigado por minhas duas maravilhosas filhas. A vocês três, toda a minha dedicação.

À todas as agências de fomento CNPq (que financia diretamente minha bolsa de pesquisa), CAPES e FAPEMIG, fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Ciências Biológicas e a todos prestadores de serviços da UFMG, que de alguma forma colaboraram com a criação deste trabalho.

**“Quem respira apressado não dura. Quem alarga os passos não caminha.” (Cap.24 - TAO TE CHING - Lao Tse)**

## RESUMO

A infecção por *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) em camundongos se assemelha à malária grave em humanos em muitos aspectos, incluindo malária cerebral e síndrome do desconforto respiratório agudo. As cumarinas são uma classe de metabólitos secundários encontrados em plantas que exibem importantes efeitos terapêuticos. Nosso objetivo foi investigar o potencial terapêutico de um composto amido-cumarínico no tratamento da malária experimental grave. Após uma triagem inicial *in vitro* de uma série de compostos fenólicos, e depois de selecionado o melhor candidato, *N*-(cumarina-3-il)cinamamida (M220), camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados com M220. O tratamento com M220 apresentou melhora de score clínicos, proteção das habilidades cognitivas e função pulmonar em camundongos infectados com PbA, observados através dos testes de reconhecimento de objeto novo e espirometria, respectivamente. Além disso, camundongos tratados demonstraram diminuição dos níveis de inflamação cerebral e pulmonar. Também foi observado aumento da sobrevivência dos camundongos infectados. A produção e o acúmulo de micróglia e células imunes que produzem as citocinas inflamatórias TNF e IFN $\gamma$  diminuíram, ao mesmo tempo em que aumentou a produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por células imunes inatas e adaptativas. No geral, o tratamento de M220 em conjunto com cloroquina promove efeitos imunomoduladores, neuroprotetores e preservadores da função pulmonar, sendo um forte candidato terapêutico para malária grave.

**Palavras-chave:** *Plasmodium berghei* ANKA, Malária cerebral, Amido-cumarina, Síndrome do desconforto respiratório agudo

## ABSTRACT

*Plasmodium berghei* ANKA (PbA) infection in mice resembles severe malaria in humans in many aspects, including cerebral malaria and acute respiratory distress syndrome. Coumarins are a class of secondary metabolites found in plants that exhibit important therapeutic effects. We aimed to investigate the therapeutic potential of an amide-functionalized coumarin compound in the treatment of severe experimental malaria. After an initial *in vitro* screening of a series of phenolic compounds, and after selecting the best candidate, *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220), C57Bl/6 mice were infected with PbA and treated with M220. Treatment with M220 showed improvement in clinical scores, protection of cognitive abilities and lung function in mice infected with PbA, observed through object recognition tests and spirometry, respectively. In addition, treated mice had lower levels of inflammation in both brain and lungs. An increase in the survival rate of the infected mice was also observed. The production and accumulation of microglia and immune cells producing the inflammatory cytokines TNF and IFN $\gamma$  decreased, while the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by innate and adaptive immune cells increased. Overall, the treatment of M220 together with chloroquine promotes immunomodulatory, neuroprotective and lung function preserving effects, being a strong therapeutic candidate for severe malaria.

**Keywords:** *Plasmodium berghei* ANKA, Cerebral malaria, Amido-coumarin, Acute respiratory distress syndrome

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Ilustração 1. Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2020.</b> .....	<b>21</b>
<b>Ilustração 2. Ciclo da malária.....</b>	<b>24</b>
<b>Ilustração 3. Quebra da barreira hematoencefálica durante a malária cerebral.</b> .....	<b>28</b>
<b>Ilustração 4. Componentes celulares envolvidos na patogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária (SDRA-AM). .....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1. Estratégia de Gate para células da imunidade inata.....</b>	<b>49</b>
<b>Figura 2. Estratégia de Gate para células da imunidade adaptativa.....</b>	<b>50</b>
<b>Figura 3. A síntese de N-(cumarin-3-il)cinamamida) (M220) [117].....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 4. Exemplos de alguns dos compostos estudados na triagem in vitro inicial, prévia à seleção do composto M220 .....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 5. Tratamento com o composto M220 protege camundongos da mortalidade e controla a parasitemia de forma mais eficiente que o antimalárico sozinho.....</b>	<b>58</b>
<b>Figura 6. Tratamento com o composto M220 reduz a lesão cerebral em camundongos infectados com PbA .....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 7. M220 preserva eficientemente a capacidade de formação de memória em camundongos infectados por PbA.....</b>	<b>61</b>
<b>Figura 8. Tratamento com o composto M220 reduz lesões e inflamações no tecido pulmonar em camundongos infectados com PbA.....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 9. Administração de M220 atenua a disfunção mecânica pulmonar durante a infecção por PbA em camundongos .....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 10. Redução de células mieloides, micróglia e aumento da produção de IL-10 observado após o tratamento com M220 em camundongos infectados com PbA .....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 11. Grupos tratados com CQ e M220+CQ apresentaram no cérebro números reduzidos de macrófagos positivos para IL-10, porém elevado o nível de produção de IL-10 .....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 12. Camundongos infectados com PbA e tratados com M220+CQ apresentam resposta Th1 e Th17 com produção de IFN<math>\gamma</math> e IL-17A reduzida.....</b>	<b>70</b>

<b>Figura 13. Efeitos do tratamento com M220 durante a resposta inflamatória induzida por PbA nos pulmões .....</b>	<b>72</b>
<b>Figura 14. Camundongos infectados e tratados com M220+CQ têm um aumento de células positivas para IL-10 e IL-17A e de linfócitos Treg no pulmão .....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 15. Tratamento com CQ e/ou M220+CQ reduz o número de macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup> positivos para TNF e IL-10 no baço de animais infectados .....</b>	<b>75</b>
<b>Figura 16. Tratamento com M220 promove redução drástica de todos os linfócitos assim como suas produções de citocinas no baço .....</b>	<b>76</b>

## LISTA DE SIGLAS

AChE: Acetilcolinesterase

ACK: Amônia-cloreto-potássio

BSA: Albumina de soro bovino

C57Bl/6: Uma linhagem de camundongos

Cdyn: complacência dinâmica

CE: Célula endotelial

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

Ci: Capacidade inspiratória

CQ: Cloroquina

Cst: complacência estática

CVF: Capacidade vital forçada

DC: Células dendríticas

FACS: Fluorescence-activated cell sorting (separação de células ativada por fluorescência)

GFP: Green Fluorescent Protein (Proteína Verde Fluorescente)

H&E: Hematoxilina e eosina

H<sub>2</sub>: Hidrogênio

H<sub>2</sub>O: Água

Hz: Hertz

i.p.: Intraperitoneal

ICAM: Intercellular Adhesion Molecule (Molécula de Adesão Intercelular)

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IFN $\gamma$ : Interferon gama

IL: Interleucina

iNOS: Óxido Nítrico Sintase Induzível (inducible Nitric Oxide Synthase)

iRBC: Células Vermelhas do Sangue Infectadas (Infected Red Blood Cells)

m/z: Massa por carga

MAO: Monoamina oxidase

MC: Malária Cerebral

MHC-1: Complexo Principal de Histocompatibilidade classe 1

MHz: Megahertz

mmol: Milimol

NK: Células Natural Killer (Células Assassinas Naturais)

NKT: Natural Killer T Cells (Células T Assassinas Naturais)

OMS: Organização Mundial da Saúde

PbA: *Plasmodium berghei* ANKA

PBS: Phosphate-buffered saline (solução tampão fosfato estéril)

PC: pico de complacência

PfEMP1: Proteína 1 da Membrana Eritrocitária de *P. falciparum*

RBC: Células Vermelhas do Sangue (Red Blood Cells)

RC: resistência e complacência

RMCBS: Rapid Murine Coma and Behavior Scale (Escala de Coma e Comportamento Rápido de Murino)

ROS: Reactive Oxygen Species (Espécies reativas de oxigênio)

Rp: resistência pulmonar

SD: Desvio padrão

SDRA: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo (ARDS - Acute Respiratory Distress Syndrome)

SDRA-AM: Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo associada à malária

SEM: Erro padrão da média

SSC: Side scatter (dispersão lateral)

T  $\gamma\delta$ : Células T gama-delta (Gamma-delta T Cells)

TA: Tempo gasto explorando o objeto familiar A

TB: Tempo gasto explorando o novo objeto B

TGF $\beta$ : Fator de Crescimento Transformador beta

TLR: Receptores do tipo Toll-like

TNF: Fator de Necrose Tumoral (Tumor Necrosis Factor)

VC: volume corrente

VEF20: Volume expiratório forçado a 20 ms

WT: Wild-type (tipo selvagem)

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	19
1.1. Epidemiologia.....	19
1.2. Patogênese.....	21
1.2.1. O cérebro: Malária cerebral.....	24
1.2.2. Pulmão: Síndrome do desconforto respiratório agudo.....	28
1.2.3. O baço.....	32
1.2.4. Modelos animais.....	33
1.2.5. Tratamentos.....	34
1.2.6. Cumarinas.....	36
2. OBJETIVOS.....	39
2.1- Objetivo geral.....	39
2.2- Objetivos Específicos.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1. Declaração de ética.....	40
3.2. Parasita e infecção dos animais.....	40
3.3. Determinação da parasitemia.....	41
3.4. Peso e sobrevida.....	41
3.5. Análises de parâmetros cognitivos e comportamentais.....	41
3.6. Teste de reconhecimento de objetos.....	42
3.7. Procedimento para a preparação da <i>N</i> -(cumarin-3-il)cinamamida (M220).....	43
3.7.1. Química.....	43
3.7.2. Preparação do precursor 3-nitrocumarina.....	44
3.7.3. Procedimento geral para a preparação de 3-amidocumarinas.....	44
3.8. Tratamentos.....	45
3.9. Espirometria.....	45

3.10. Imunofenotipagem por citometria de fluxo .....	46
3.10.1. Isolamento de células do cérebro .....	46
3.10.2. Isolamento de células do pulmão.....	46
3.10.3. Isolamento de células do baço .....	47
3.10.4. Marcação de células para citometria .....	47
3.11. Análise Histopatológica e Morfométrica .....	50
3.12. Análise estatística .....	52
4. RESULTADOS.....	53
4.1 Química.....	53
4.1. Tratamento com o composto M220 protege camundongos da mortalidade e controla a parasitemia de forma mais eficiente que o antimalárico sozinho .....	56
4.2. Tratamento com o composto M220 reduz a lesão cerebral em camundongos infectados com PbA .....	59
4.3. M220 preserva eficientemente a capacidade de formação de memória em camundongos infectados por PbA .....	61
4.4. Tratamento com o composto M220 reduz lesões e inflamações no tecido pulmonar em camundongos infectados com PbA.....	62
4.5. Administração de M220 atenua a disfunção mecânica pulmonar durante a infecção por PbA em camundongos.....	64
4.6. Redução de células mieloides e micróglia e aumento da produção de IL-10 após o tratamento com M220 em camundongos infectados com PbA .....	65
4.7. Grupos tratados com CQ e M220+CQ apresentaram no cérebro números reduzidos de macrófagos positivos para IL-10, porém elevado o nível de produção de IL-10.....	67
4.8. Camundongos infectados com PbA e tratados com M220 apresentam redução dos níveis de produção de IFN $\gamma$ e IL-17A por células Th1 e Th17, e aumento de IL-10.....	69
4.9. Efeitos do tratamento com M220 durante a resposta inflamatória induzida por PbA nos pulmões .....	71

4.10. Camundongos infectados e tratados com M220+CQ têm um aumento de células positivas para IL-10 e IL-17A e de linfócitos Treg no pulmão.....	73
4.11. Tratamento com CQ e/ou M220+CQ reduz o número de macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C <sup>hi</sup> positivos para TNF e IL-10 no baço de animais infectados.....	74
4.12. Tratamento com M220 promove redução drástica de todos os linfócitos assim como suas produções de citocinas no baço .....	76
5. DISCUSSÃO .....	78
6. CONCLUSÃO.....	89
7. PERSPECTIVAS .....	90
8. REFERÊNCIAS.....	91
Anexo .....	106

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Epidemiologia

A Malária é uma doença infecciosa causada pelo protozoário do gênero *Plasmodium*, e existem pelo menos seis espécies conhecidas de *Plasmodium* que infectam humanos: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, *P. knowlesi* (1) e o mais recentemente descrito *P. simium* (2). Sua transmissão pode ocorrer através da picada da fêmea de anófeles, transfusão de sangue infectado ou transplacentária, da mãe infectada para o feto (3).

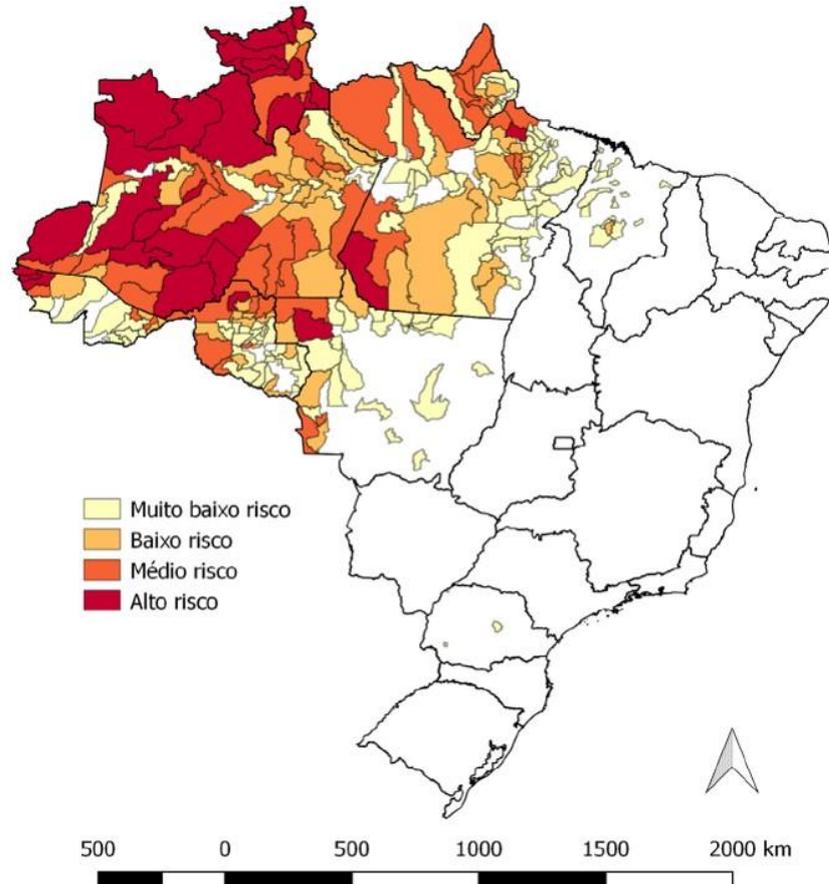
A malária é uma doença infecciosa negligenciada e a principal causa de morbidade e mortalidade em 91 países endêmicos (4). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), no ano de 2021 estima-se 247 milhões de casos e 627 mil casos de mortes em todo o mundo (4). Embora evitável e tratável, a malária segue a ter um impacto devastador na saúde e nos meios de subsistência das pessoas em todo o globo, segundo a Organização Mundial da Saúde (4,5).

Durante os dois anos de pico da pandemia de COVID-19 (2020-2021), a descontinuidade no controle de vetores e serviços relacionados à malária (4) levou a aproximadamente 13 milhões de casos e 63.000 mortes relacionadas à doença. A região africana continua a suportar uma carga global desproporcional de malária, sendo responsável por cerca de 95% de todas as ocorrências em 2021, bem como 96% das mortes. As crianças menores de 5 anos representam cerca de 80% dos óbitos por malária nessa região. Quatro países africanos são responsáveis por mais da metade de todas as mortes relacionadas à malária no mundo: Nigéria (31,3%), República Democrática do Congo-Brazzaville (12,6%), República Unida da Tanzânia (4,1%) e Níger (3,9%) (4–7).

No Brasil, a distribuição dos casos de malária em uma determinada área varia de estado para estado. Em 2021, alguns estados da Amazônia tiveram as maiores taxas de transmissão rural de malária: Acre (70,3%), Amapá (47,5%), Amazonas (41,6%), Maranhão (90,8%) e Rondônia (56,8%). No estado de Roraima, 57,6% dos casos iniciais foram transferidos de áreas indígenas (**Ilustração 1**). Em áreas garimpeiras, a transmissão foi mais alta nos estados do Pará (40,6%) e Mato Grosso (70,2%) (8).

Em relação às internações e mortes por malária, em 2020 houve 1.457 internações, enquanto em 2021, de acordo com dados preliminares, houve 1.528, representando um aumento de 4,9% em relação ao ano anterior. O maior aumento de internações ocorreu na região não amazônica, com 149 em 2020 e 189 em 2021 (aumento de 26,9%). Em relação às mortes, houve 44 óbitos em 2020, um aumento de 18,9% em relação ao ano anterior, e 49 óbitos em 2021, um aumento de 11,4% em relação a 2020 (4–7).

A Estratégia Técnica Global para a Malária 2016-2030 foi adotada pela Assembleia Mundial da Saúde em maio de 2015. Ela estabelece a meta de reduzir a incidência global e as taxas de mortalidade relacionadas à malária em pelo menos 90% até 2030, fornecendo uma estrutura abrangente para orientar os países em seus esforços para acelerar o progresso rumo à eliminação da malária (4–7).



**Ilustração 1. Mapa de risco de malária por município de infecção, Brasil, 2020.**

Fonte: Sivep-Malária e Sinan/SVS/MS. Data de atualização: Sivep-Malária em 30 de março de 2021 e Sinan em 26 de março de 2021. Excluídos resultados negativos, nulos e as LVC.

## 1.2. Patogênese

Os primeiros relatos da malária, encontramos sua possível documentação pela primeira vez na China +/- 2700 anos aC. Há registros em argila, de 2.000 aC na Mesopotâmia e em papiros egípcios de 1570 aC, de informações a respeito de uma enfermidade semelhante à malária. Durante milhares de anos, pensou-se que a malária era causada por miasmas dos pântanos (9).

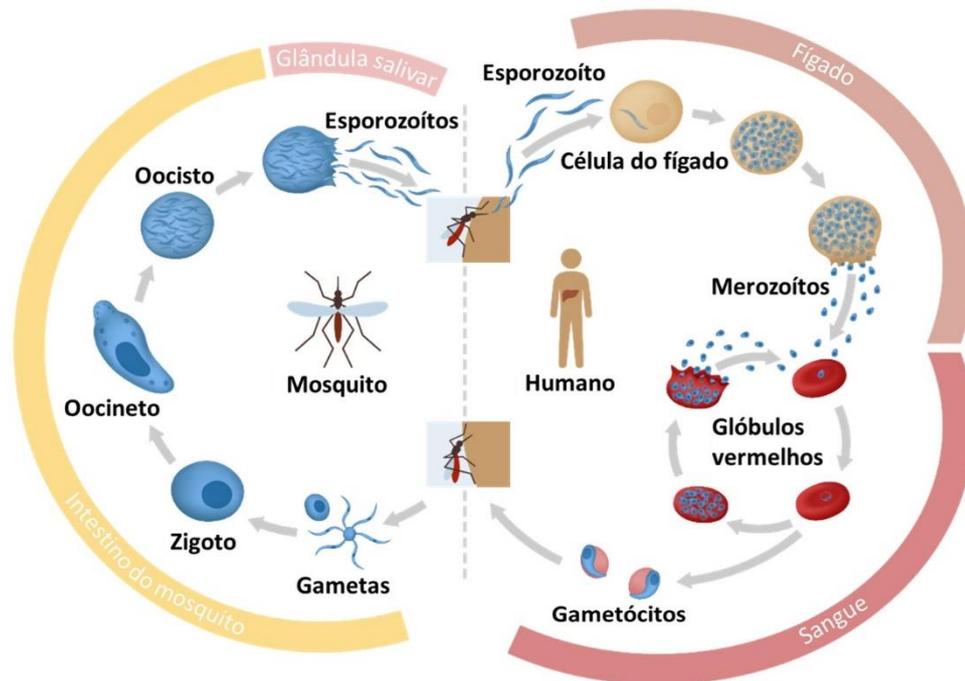
Na Roma antiga, a relação entre águas estagnadas nos pântanos e febres durante os meses de verão foi reconhecida, levando à crença de que o ar ruim, denominado "mal aria", era a causa da doença. Engenheiros romanos desenvolveram

sistemas de drenagem que reduziram significativamente a malária em áreas drenadas. Após a queda de Roma, os bárbaros conquistadores tornaram-se vítimas da malária, com Alarico, o primeiro príncipe bárbaro a conquistar Roma, falecendo de malária. Na era moderna, a dificuldade dos médicos em diferenciar entre malária e febre tifoide levou ao uso do termo "tifo-malária" como diagnóstico para febres agudas (10).

Destaca-se a contribuição de William Osler, que conseguiu diferenciar clinicamente a malária da febre tifoide com base em critérios clínicos distintos (11). Os sintomas da malária, como calafrios, febre e suores, são descritos em detalhes, juntamente com a importância da periodicidade dos paroxismos. A compreensão histórica e diagnóstica da malária ao longo dos séculos, desde Hipócrates até Osler, destaca a evolução do conhecimento médico sobre essa doença infecciosa (10). Somente quando se descreveu a presença de microrganismos como bactérias sendo causadores de doenças, em 1880, foram detectados parasitos no sangue de pacientes com malária. No século que se sucedeu, a ciência descreveu os muitos estágios do ciclo do *Plasmodium* em mosquitos e mamíferos elucidando cada vez mais a doença (9).

Dessa forma, sabemos hoje que, a malária é transmitida aos hospedeiros vertebrados pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles* que estão infectados, com parasitas protozoários do gênero *Plasmodium* [3,10]. O mosquito, vetor do parasita causador da malária, injeta um pequeno número de esporozoítos infecciosos na corrente sanguínea, durante o repasto sanguíneo (3,12). Os esporozoítos são então conduzidos ao fígado, onde invadem e se replicam nos hepatócitos, caracterizando um período clinicamente silencioso da infecção (12–14).

Após a conclusão da replicação no estágio hepático, o parasita inicia a infecção no estágio sanguíneo (12,15). Dentro das hemácias, os milhares de merozoítos se multiplicam assexuadamente (12,15). Após aproximadamente 48 horas, os merozoítos são liberados na corrente sanguínea onde novamente infectam outras hemácias retroalimentando o estágio sanguíneo (15,16). À medida que cresce a infecção, o parasita altera a composição da membrana das hemácias que contêm o parasito expressando ligantes citoaderentes que interagem com vários receptores de adesão presentes no revestimento endotelial (12). Essas propriedades citoaderentes permitem o sequestro de células vermelhas infectadas (iRBC) com *Plasmodium* no endotélio dos órgãos. Isso permite que o parasita escape da depuração esplênica (17) ligando-se a receptores expressos por células endoteliais, presente nos vasos sanguíneos, facilitando a entrada em vasculaturas profundas de órgãos como cérebro, pulmões e placenta (12). Alguns merozoítos se diferenciam em gametócitos que, quando absorvidos por outro mosquito que venha se alimenta do hospedeiro infectado, perpetuam o ciclo sexual no inseto e fecham o ciclo de transmissão e infecção da malária (12,15). Esquema resumido do Ciclo na **Ilustração 2**.



**Ilustração 2. Ciclo da malária.**

Modificado de: <https://www.yourgenome.org/facts/what-is-malaria/>

### 1.2.1. O cérebro: Malária cerebral

A malária grave ocorre tipicamente devido ao atraso no tratamento da malária não complicada. Este estágio da doença é definido por evidências clínicas ou laboratoriais e disfunções vitais. Dentre as possíveis manifestações incluem, anemia malárica grave, malária cerebral (MC) e complicações pulmonares que podem levar à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (18–20). A patogênese da MC em humanos ainda é debatida. Uma hipótese é de que ela resulta da aderência e sequestro de hemácias parasitadas, células imunes e plaquetas às células endoteliais vasculares (21,22) podendo causar ruptura da barreira hematoencefálica e microhemorragia, ou ainda, devido a fatores metabólicos e por mediadores inflamatórios resultado de uma resposta imunológica excessivamente vigorosa, originalmente desenvolvida para a proteção do hospedeiro (23–25).

A adesão dos eritrócitos no endotélio cerebral é um indicador de MC em adultos e crianças, sendo consideradas o ponto de partida durante o desenvolvimento de MC. A captação é provavelmente uma interação específica entre iRBC e células endoteliais vasculares (CEs). Esta não se limita ao tecido cerebral, mas também ocorre em CEs de vários órgãos, incluindo pulmão, rim, fígado e intestino. A adesão de iRBCs ao endotélio vascular é mediada pela proteína 1 da membrana eritrocitária de *P. falciparum* (PfEMP1), um ligante específico da superfície celular expresso por iRBCs (21,26).

A ligação de iRBCs ao endotélio microvascular cerebral é acompanhada pela agregação de rosetas formadas pela ligação de iRBCs a outros iRBCs, plaquetas, glóbulos brancos e glóbulos vermelhos não infectados (27). A captação microvascular de iRBCs pode proteger os iRBCs da remoção esplênica. Isso enfraquece ainda mais a capacidade degenerativa de iRBCs e hemácias, resultando em oclusão vascular. Estudos anteriores relataram uma correlação significativa entre a captação de iRBC nos vasos cerebrais e coma em pacientes com MC (28,29). O enxerto de iRBC aumenta a vasoconstrição e a oclusão vascular e reduz o fluxo sanguíneo cerebral e a hipóxia (21). Embora a maioria dos sobreviventes se recupere completamente, de 3 a 31% dos pacientes ainda apresentam danos neurológicos e/ou sequelas cognitivas (30). A prevalência de déficits neurológicos em crianças é maior do que em adultos, variando de 6% a 29% (31). As crianças com MC geralmente apresentam déficits neurológicos e sequelas de longo prazo (32).

Durante a infecção por *Plasmodium* a imunidade inata funciona como a primeira linha de defesa controlando o crescimento do parasita e regulando o desenvolvimento da imunidade adaptativa (33,34). A ativação dos componentes celulares do sistema imune inato, como as células dendríticas (DCs), é importante para o estabelecimento

da imunidade adquirida (35). Células apresentadoras de antígeno como DCs e macrófagos, reconhecem fatores associados ao parasito, levando as respostas imunes mediadas por receptores toll-like (TLR) e outros receptores (36,37). Células DCs produzem uma ampla gama de citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, IL12 e IL-6, e quimiocinas, como CXCR3 (38), CCL2, CXCL8 e CXCL10 em resposta aos parasitos da malária (39,40).

Ao longo dos estágios iniciais da infecção por malária, as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são ativadas por células apresentadoras de antígenos (APCs) para iniciar respostas imunes celulares protetoras antimaláricas (41). A quimiotaxia das células T para os vasos cerebrais periféricos é uma das características proeminentes da MC (41,42). O recrutamento de células T CD8<sup>+</sup> para os vasos cerebrais periféricos é uma das características predominantes do início da MC (43), e no baço, a apresentação de antígenos de iRBCs por DCs para células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (44,45). Células NK e macrófagos são ativados por iRBCs para liberar citocinas inflamatórias, como TNF, IFN $\gamma$ , IL1 $\beta$ , IL12 e quimiocinas (46).

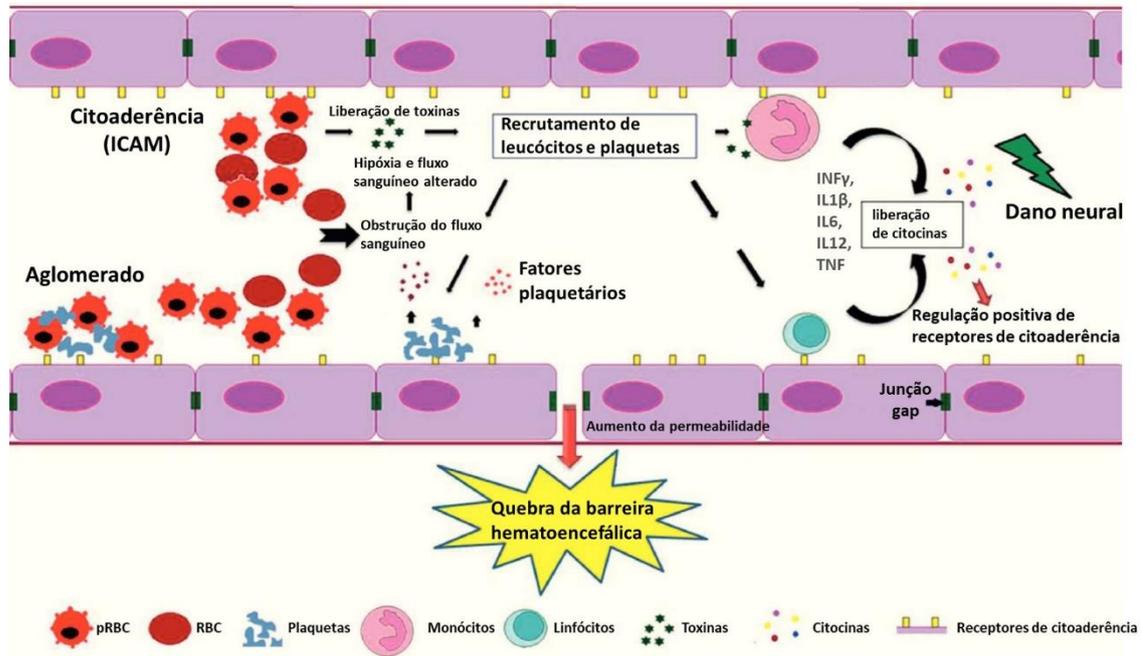
A IL12 produzida pelas DCs ativa as células NK a produzirem IFN $\gamma$ , que promove respostas preferencialmente Th1 (47). As células T CD4<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$  (Th1) estão envolvidas no início da resposta adaptativa à infecção malárica, estimulando ainda mais a diferenciação Th1 e, posteriormente, estimulando as células B a produzir anticorpos específicos para eliminar os parasitas da malária (33). No entanto, as respostas pró-inflamatórias contribuem para o desenvolvimento da MC (33,48) e disfunção pulmonar, devido aos elevados níveis de IFN $\gamma$  e TNF, que podem induzir um padrão de expressão de quimiocinas responsáveis por estimular a migração das células T e outros leucócitos (49).

As características patológicas na MC incluem obstrução das veias cerebrais por eritrócitos infectados, hemorragia microscópica, isquêmica e generalizada, e proliferação glial, levando à formação de astrócitos e agregados microgliais (50). A adesão de iRBCs e a liberação de citocinas inflamatórias podem ativar CEs cerebrais, desencadeando CEs para produzir quimiocinas e citocinas inflamatórias e aumentar a expressão de ICAM. A ativação de células T CD8<sup>+</sup> resulta na expressão de receptores de quimiocinas, incluindo CXCR3 e CCR5. Subsequentemente, os receptores de quimiocina ligam-se aos ligantes de quimiocina expressos por CEs para induzir a migração de células T CD8<sup>+</sup> e a infiltração em CEs cerebrais. Receptores na superfície da membrana (CD11a) de células T CD8<sup>+</sup> promovem a adesão ao ICAM-1 endotelial (46,51), e a expressão regulada positivamente de ICAMs induz aumento do recrutamento de iRBCs, leucócitos e plaquetas em capilares cerebrais, aumentando o sequestro microvascular cerebral (52).

A ruptura de iRBCs libera merozoítos, os quais são endocitados por CEs e então apresentados de forma cruzada em moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe 1 (MHC-1). O MHC-1 se liga aos receptores de antígeno - receptor de células T - nas células efectoras para ativar as células T CD8<sup>+</sup>. Após a ativação, células T CD8<sup>+</sup> liberam granzima-B, perforina e quimiocinas, fazendo com que os macrófagos e as células NK migrem em direção ao cérebro (21). O acúmulo de células imunes e a liberação de perforina induzem sinalização apoptótica em CEs e alteram as junções gap, resultando em disfunção e no aumento da permeabilidade vascular cerebral (53,54). O rompimento da integridade da barreira hematoencefálica frequentemente resulta em aumento do espaço perivascular, formação de edema e aumento da pressão intracraniana, eventualmente resultando em morte (21).

Esquema resumido do rompimento da barreira hematoencefálica na MC na **Ilustração**

3.



**Ilustração 3. Quebra da barreira hematoencefálica durante a malária cerebral.**

Modificado de: DOI:10.1016/j.bjid.2013.03.004

### 1.2.2. Pulmão: Síndrome do desconforto respiratório agudo

A síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) associada à malária é uma complicação menos caracterizada da malária grave em comparação com a malária cerebral (55–57). A disfunção pulmonar ocorre em 20% de todos os casos de adultos com *P. falciparum* (57) ou *P. vivax* (58). Na malária grave, mais da metade dos pacientes acometidos desenvolve a síndrome do SDRA (58). A síndrome do desconforto respiratória aguda associada a malária (SDRA-AM) tem como principais características a troca gasosa dificultada, aumento de mediadores inflamatórios causando inflamação aguda, lesão do endotélio alveolar e do parênquima pulmonar, que conseqüentemente, causa disfunções e aumento da permeabilidade da barreira

alvéolo-capilar pulmonar formando edema e culminando em insuficiência respiratória, levando à morte (18,59,60). Quase todas as espécies de *Plasmodium* que infectam humanos podem induzir SDRA-AM incluindo *P. malariae* (61), *P. ovale* (62) e *P. knowlesi* (63) entretanto, essa síndrome é mais comum na malária por *P. falciparum* (64) e *P. vivax* (65).

Na SDRA-AM, a dispneia pode aparecer repentinamente ou pode piorar após várias horas a vários dias de terapia antimalárica bem tolerada. Isso ocorre apesar da parasitemia reduzida ou negativa (57,66), sendo frequentemente relatado na malária recebendo terapia antimalárica padrão (56). Uma vez que, a infecção por *P. vivax* causa baixa parasitemia, isso sugere que *P. vivax* e seus subprodutos têm maior potencial inflamatório para induzir SDRA-AM após o tratamento antimalárico (55,56). Atualmente, não há tratamento específico para SDRA-AM, apenas intervenções de controle respiratório conforme as diretrizes de tratamento estabelecidas para lesão pulmonar aguda/síndrome do desconforto respiratório agudo (LPA/SDRA) não relacionados à malária (55).

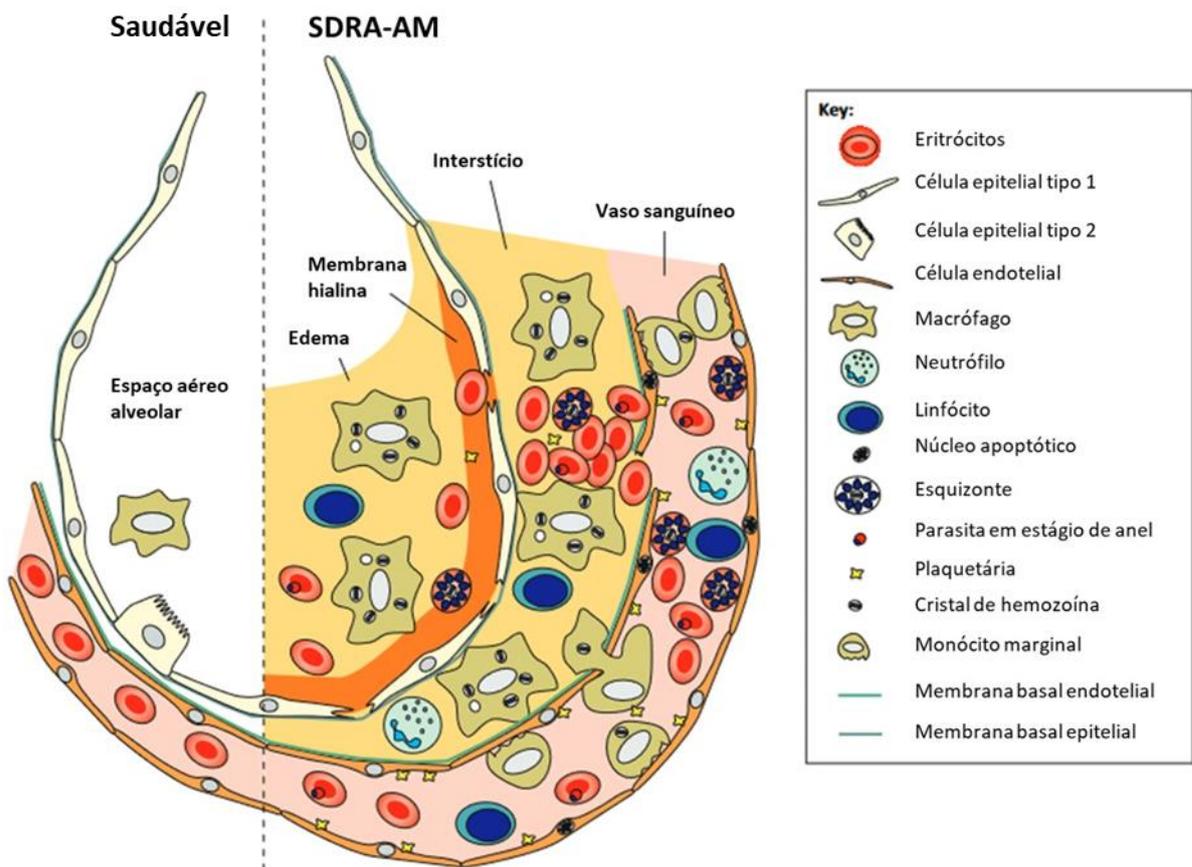
Estudo mostra, através do teste de espirometria, que pacientes infectados com malária apresentam membranas capilares alveolares danificadas, levando ao edema e hipovolemia nos capilares pulmonares (67). O bloqueio dos capilares pulmonares foram causados por células imunes infectadas e glóbulos vermelhos infectados sequestrados (iRBCs) (67).

Respostas inflamatórias são essenciais para que o hospedeiro controle o crescimento do parasita. No entanto, uma reação exagerada e descontrolada pode levar a doenças graves. Níveis séricos elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, TNF, IL1 $\beta$ , IL-6, IL-17, IFN $\gamma$  (68,69) e níveis reduzidos de citocinas anti-inflamatórias, IL-10 e TGF $\beta$  (70), foram associados à malária grave em humanos e

descritos extensivamente para malária cerebral (70,71). No entanto, o conhecimento sobre esses parâmetros em pacientes com SDRA-AM ou fluido de lavagem broncoalveolar é limitado (72). Os perfis de citocinas no local da patogênese são críticos, pois fornecem sinais que determinam e perpetuam as respostas inflamatórias localmente no tecido e podem refletir a extensão da lesão (55). Durante a fase aguda da infecção sanguínea, a ativação das células da imunidade inata, ao detectar padrões moleculares associados a patógenos por meio de seus receptores, desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF, que desempenham um papel fundamental na indução da resposta febril como parte da defesa imune do hospedeiro. (73). Além disso, no pulmão, os macrófagos alveolares que abrigam iRBCs e hemozoína fagocitados podem ser uma fonte essencial de IL-6 e TNF, onde os níveis elevados foram fortemente associados à inflamação pulmonar durante a fase aguda do estabelecimento da SDRA-AM (73). Esquema da patogênese da SDRA-AM na **Ilustração 4**.

O IFN $\gamma$  é uma citocina essencial induzida e descobriu-se que inibe os estágios sanguíneos do *Plasmodium*. O IFN $\gamma$  é produzido por vários subconjuntos de células imunes dos braços da imunidade inata e adaptativa em diferentes fases da infecção no estágio sanguíneo (74). Na fase inicial da infecção no estágio sanguíneo, células NK, células NKT, células T  $\gamma\delta$  e células T foram os principais produtores, seguido por uma mudança de papel para as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na fase posterior de infecção (75). Altos níveis de IFN $\gamma$  na fase inicial da infecção no estágio sanguíneo têm sido amplamente correlacionados com a proteção contra a malária grave e o controle do crescimento sistêmico do parasita, mas podem aumentar o risco de desenvolver malária grave na fase posterior da infecção (75). Foi demonstrado que o IFN $\gamma$  desempenha um papel patogênico no desenvolvimento da SDRA-AM, pois a infecção

de modelos de camundongos deficientes em sinalização de IFN $\gamma$  foram protegidos contra lesões pulmonares, apesar do aumento da transmigração e infiltração de leucócitos e células T efetoras ativadas no tecido pulmonar (76,77). Além disso, o IFN $\gamma$  mostrou ser necessário para a maturação de células dendríticas derivadas de monócitos produtoras de TNF/iNOS que poderiam aumentar a citotoxicidade das células T CD8<sup>+</sup> para causar lesão pulmonar em camundongos infectados com PbNK65 (77).



**Ilustração 4. Componentes celulares envolvidos na patogênese da síndrome do desconforto respiratório agudo associada à malária (SDRA-AM).**

Modificado de: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.04.006>

### 1.2.3. O baço

Outro órgão afetado pela malária grave é o baço, tanto por sua função no desenvolvimento de respostas imunes adaptativas, quanto envolvido na filtração seletiva e eliminação de hemácias aberrantes, anormais, danificadas ou senescentes, a remoção de agentes infecciosos, e a remoção de corpos de inclusão (78,79). É um componente central na imunologia da malária, facilitando a apresentação do antígeno fagocitado da malária aos linfócitos (80). A remoção de iRBCs pelo baço é importante na proteção contra doenças graves, enquanto a remoção de hemácias não infectadas é um fator-chave para a anemia (80) portanto, contribui para a patogênese.

#### 1.2.4. Modelos animais

A fisiopatologia da MC e da SDRA-AM são altamente complexas e não podem ser totalmente elucidadas por observações clínicas de humanos infectados. Modelos animais que mimetizam aspectos da malária humana, além de permitirem estudos e intervenções farmacológicas e/ou terapêuticas, contribuem para a elucidação de diversas questões obscuras nessa relação do *Plasmodium* com humanos (81).

Camundongos infetados com *P. berghei* ANKA (PbA) mimetizam aspectos da MC desenvolvida por humanos, além de ser um modelo murino amplamente utilizado para estudar os aspectos do desenvolvimento da doença (81,82). Assim como em humanos, na infecção por *Plasmodium*, primeiramente a imunidade inata atua sobre a infecção em favor do hospedeiro, atacando o parasita e posteriormente promovendo a imunidade adaptativa e da memória imunológica (33). Em resposta à infecção, DC e macrófagos fagocitam e apresentam para células da imunes através de receptores TLR, juntamente com outros receptores (36). Essas células produzem citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF, IL12 e IL-6, bem como quimiocinas (38,46), e os linfócitos T CD4 que produzem principalmente IFN $\gamma$ , têm sido associados à suscetibilidade à patogênese da malária cerebral e pulmonar (76,83). Altos níveis de IFN $\gamma$  e TNF contribuem para o desenvolvimento de MC (33,48) e disfunção pulmonar, induzindo quimiocinas nesses órgãos que estimulam a migração dos linfócitos T e outros leucócitos, como os monócitos Ly6C<sup>hi</sup>, contribuindo para danos graves ao cérebro e ao pulmão (84). Por outro lado, citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 controlam as respostas inflamatórias e previnem o dano tecidual (85) e desempenham um papel protetor na MC experimental induzida por PbA (86).

No entanto, as diferenças na patogênese entre os modelos de camundongos e seres humanos devem ser lembradas antes de tirar conclusões a respeito dos achados. Além disso, os detalhes da progressão da doença, método de infecção, dose de inóculo do parasita, linha/clone do parasita e antecedentes genéticos do camundongo devem ser examinados para selecionar modelos adequados de MC e SDRA-AM em camundongos e estabelecer comparações válidas entre os modelos animais e a malária humana (22).

### 1.2.5. Tratamentos

Estresse oxidativo pode ser induzido por drogas antimaláricas, uma vez que o parasita *Plasmodium* é vulnerável a ROS (*reactive oxygen species*), não é surpreendente que diferentes tratamentos para malária explorem essa propriedade do parasita para limitar e inibir seu crescimento em um hospedeiro humano. Quinolonas, incluindo cloroquina (CQ) e amodiaquina, agem inibindo a conversão de heme livre em hemozoína em eritrócitos infectados, aumentando efetivamente o estresse oxidativo nos parasitos *Plasmodium* (87).

Embora o principal mecanismo de resistência à CQ dependa da capacidade dos parasitas de impedir que a droga se acumule em seus vacúolos digestivos, um aumento na capacidade antioxidante dos parasitas pode contribuir para a resistência aos medicamentos. Notavelmente, cepas de malária humana (*P. falciparum*) e de roedores (*P. yoelii* e *P. berghei*) resistentes à CQ demonstraram ter atividade aumentada da enzima antioxidante glutathione-S-transferase em comparação com cepas da mesma espécie suscetíveis à CQ (88), podendo ajudar esses parasitas a neutralizar a carga oxidativa causada pela droga. Outra grande família de medicamentos antimaláricos são as artemisininas, que incluem a diidroartemisinina e o artesunato (87). Essas drogas também exercem seus efeitos antiparasitários

umentando o estresse oxidativo no parasita. Um dos mecanismos de ação propostos para a artemisinina postula que sua interação com o ferro leva à produção de radicais livres (89).

Notavelmente, o antioxidante *N*-acetilcisteína foi capaz de neutralizar o efeito antiparasitário do artesunato sobre o *P. falciparum*, reforçando ainda mais a hipótese de que essas drogas agem promovendo a produção de radicais livres sendo prejudiciais sobre parasitas (90). Embora o aumento do estresse oxidativo seja um mecanismo de ação eficaz para a eliminação do parasita, ele também pode afetar negativamente o hospedeiro. Os pacientes com malária tratados com antimaláricos apresentaram maior peroxidação lipídica e níveis mais baixos de antioxidantes do que os pacientes não tratados (91), sugerindo que os medicamentos antimaláricos aumentam o estresse oxidativo no hospedeiro.

Portanto, efeitos colaterais não são incomuns em vários tratamentos com antimaláricos. Existem relatos de pacientes cujos sintomas da malária se sobrepõem aos efeitos colaterais dos antimaláricos, como a continuação dos sintomas após o tratamento ou até mesmo a exacerbação de mais sintomas após o tratamento (57,92). Comumente são utilizados o Artesunato, CQ, Mefloquina, entre outros medicamentos, que apresentam certa eficácia no combate ao parasito da malária e também atenuando sintomas algicos e na febre (92,93). Pacientes infectados com *P. vivax* e tratados com CQ apresentam aumento dos sintomas de náusea, diarreia, colúria, dispneia, entre outras (92). Entre os efeitos colaterais graves descritos estão cardiomiopatias e miopatias (94). A CQ também pode causar convulsões em pacientes com epilepsia e lúpus eritematoso sistêmico (94,95). Além disso, o tratamento antimalárico também pode causar disfunção pulmonar (67,96). Os

tratamentos médicos para a malária continuam sendo um empreendimento delicado, tornando urgente a identificação de opções terapêuticas menos tóxicas.

#### 1.2.6. Cumarinas

A cumarina foi isolada pela primeira vez em 1820 por Vogel (97), da fava tonka (*Dipteryx odoranta*) conhecida como *Coumarou*. Desde então, o isolamento, caracterização estrutural, síntese e bioatividade de milhares de cumarinas naturais de plantas, bactérias, fungos [96] e síntese química foram relatados (99).

Nas plantas, as cumarinas atuam como antioxidantes e inibidoras enzimáticas e atuam nos reguladores do crescimento e da fotossíntese, bem como na defesa contra infecções (100). São encontradas em concentrações consideravelmente altas em *Coumarouna odorata* (fava tonka) (101), na erva baunilha (*Anthoxanthum odoratum*) (102), canela cássia (*Cinnamomum cassia*) (103), em extratos de *Justicia pectoralis* (104) e em uma grande número de cerejeiras em flor (105). Algumas espécies da família Apiaceae são ricas em cumarina (101). Fava tonka, alcaçuz e canela cássia têm uma alta concentração de cumarinas naturais. Apesar de seu cheiro doce, os animais tendem a evitar plantas que contenham cumarinas devido ao seu sabor amargo (106).

As cumarinas ganharam interesse devido às potenciais atividades farmacológicas que apresentam (107,108). Graças à sua arquitetura estrutural simples e estabilidade química, as cumarinas podem ser facilmente sintetizadas e modificadas para produzir compostos mais ativos e seletivos (109), podendo exercer diversas atividades, tais como antioxidantes e agentes anti-inflamatórios (110), antidepressivos (111), anticonvulsivantes (112), antibacterianos (113), antivirais (114),

agentes anticarcinogênicos (115,116), anticoagulantes (117) e agentes neuroprotetores (118–120), entre outras atividades.

Alterações feitas em sua estrutura base tornam as cumarinas potencialmente eficientes no tratamento de doenças neurodegenerativas (121,122). Matos e colaboradores sintetizaram séries de derivados de cumarina substituídos na posição três do esqueleto químico, que funcionam como inibidores das isoformas da monoamina oxidase A e B (MAO-A e MAO-B), da acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE), tendo aplicação farmacológica em doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson (118,121,123,124). Segundo os resultados dos estudos de permeabilidade de membranas (PAMPA), muitas das moléculas descritas têm a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e chegar ao cérebro. Além disso, essas moléculas descritas por Matos e colaboradores apresentam interessantes propriedades antioxidantes e neuroprotetoras. *Coriandrum sativum* (coentro) contém cumarina como um componente eficaz com efeitos neuroprotetores que melhoram a memória. A esse respeito, foi relatado que vários derivados cumarínicos inibem seletivamente a enzima MAO-B, implicada na doença de Parkinson (125). Estas duas últimas características, juntamente com a capacidade de chegar ao cérebro, foram a principal inspiração para a seleção das cumarinas como candidatos para o estudo da sua atividade na MC.

Já foi relatado o uso de cumarinas como construções de compostos antimaláricos, como relatado por Neha Batra e colaboradores (126), que apresentaram compostos híbridos de cumarina com atividade *in vitro* sobre *P. falciparum*. Cuellar e colaboradores também descreveram em outros compostos cumarínicos atividades antimaláricas *in vivo* (127).

As propriedades antioxidantes e neuroprotetoras das cumarinas, juntamente com a sua capacidade de atravessar barreiras e chegar ao cérebro, foram a principal inspiração para a seleção das cumarinas como candidatos para o estudo da sua atividade na MC.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1- Objetivo geral**

Investigar o potencial terapêutico do composto à base de Amido-cumarina (M220) no tratamento da malária grave experimental

### **2.2- Objetivos Específicos**

- Caracterizar o desenvolvimento da parasitemia, sobrevivência e o desenvolvimento clínico de animais tratados com M220 sozinho e/ou em conjunto com cloroquina, em animais infectados com PbA.
- Avaliar os danos no tecido cerebral de animais infectados com PbA e a possível mitigação por meio dos tratamentos com M220 sozinho e/ou em conjunto com cloroquina.
- Investigar a potencial proteção cognitiva do M220 em animais infectados com PbA.
- Avaliar os danos no tecido pulmonar de animais infectados com PbA e a possível mitigação por meio dos tratamentos com M220 sozinho e/ou em conjunto com cloroquina.
- Avaliar a função pulmonar em animais infectados com PbA e/ou tratados com M220 sozinho e/ou em conjunto com cloroquina
- Investigar os principais perfis celulares inflamatórios no tecido cerebral, pulmonar e esplênico de animais infectados com PbA e tratados com M220 sozinho e/ou em conjunto com cloroquina.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Declaração de ética

Camundongos fêmeas C57Bl/6 (8–10 semanas de idade) foram obtidos no Biotério Central de Animais (ICB – UFMG). Os camundongos foram mantidos em microisoladores contendo comida e água *ad libitum*, de acordo com as Diretrizes Brasileiras de utilização de Animais para Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica e o Guia para o Cuidado e Uso de Camundongos de Laboratório do National Institutes of Health (NIH). Este estudo foi aprovado pelo Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Minas Gerais (97/2018 e 345/2023).

#### 3.2. Parasita e infecção dos animais

Os camundongos foram infectados com a cepa *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) Green Fluorescent Protein (GFP) clone cl15cy1 (a qual expressa Green Fluorescent Protein, GFP, constitutivamente durante todo o ciclo de vida), doada pelo Prof. Dr. Cláudio Romero Farias Marinho (Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo, USP). A via de infecção foi intraperitoneal (i.p.) com inóculo padronizado de  $1 \times 10^5$  hemácias parasitadas por camundongo, em solução tampão fosfato estéril (PBS, 200  $\mu$ l). Os eritrócitos parasitados (pRBC) usados para infectar os camundongos dos grupos experimentais foram obtidos através de uma passagem *in vivo* em camundongos WT até alcançarem um percentual de pRBC entre 5 a 8% (82,128). A parasitemia foi obtida através de análise da expressão de GFP por citômetro de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os animais dos grupos controles, sem infecção, receberam, o mesmo volume de PBS (200  $\mu$ l) apenas por via i.p.

### 3.3. Determinação da parasitemia

Para determinar a evolução da parasitemia nos animais, a partir do 3º dia pós-infecção (dpi), foi coletada uma gota de sangue da cauda ( $\pm 5 \mu\text{l}$ ) e diluída em 500  $\mu\text{l}$  de PBS estéril para análise por citometria de fluxo FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). Os dados foram analisados no software FlowJo (versão 10 - Tree Star, Ashland, OR, USA). Eritrócitos obtidos de camundongos selvagens C57Bl/6 não infectados foram usados como parâmetros para identificar propriedades específicas de tamanho versus granularidade (FSC/SSC) e a ausência de fluorescência GFP. Os glóbulos vermelhos parasitados (pRBCs) foram identificados pelo aumento da fluorescência verde e expressos em porcentagem de pRBC. Para cada amostra, um total de 100.000 eventos foi adquirido.

### 3.4. Peso e sobrevida

As variações de peso e a sobrevida dos animais foram monitoradas diariamente ao longo da infecção. Os animais foram mantidos com água e ração *ad libitum*.

### 3.5. Análises de parâmetros cognitivos e comportamentais

Os parâmetros cognitivos e comportamentais foram avaliados por meio da bateria de análises de sinais clínicos que indicam o desenvolvimento e estabelecimento da doença, baseada no parâmetro de Escala de Coma e Comportamento Rápido de Murino (The Rapid Murine Coma and Behavior Scale – RMCBS, (129)). A bateria preliminar consiste em uma escala de observações quantitativas e semiquantitativas de reflexos e funções sensoriais básicas. Esta série de 10 testes é baseada na bateria de testes desenvolvida por Irwin (1968 - (130)) e fornece um perfil comportamental e funcional a partir da avaliação do desempenho

individual de cada animal (131,132). A bateria RMCBS foi realizada a partir do 3º dpi com os animais do grupo controle e com os camundongos infectados, tratados ou não. Para execução da bateria RMCBS, o camundongo é colocado em uma caixa de observação, localizada em cima de uma grade suspensa, e avaliado durante cinco minutos em relação à posição corporal, o quanto ele explora a caixa, o “groomings” (movimentos de “limpar” dirigidos à cabeça ou corpo, efetuados com as patas dianteiras), à ereção do pelo, à marcha, o escape ao toque, à agressividade e à capacidade de se erguer sobre as patas caudais. O animal é então suspenso pela cauda e avaliado, sobre uma grade colocada em cima da arena, quanto à presença de encurvamento do tronco, à capacidade de se segurar pelas patas craniais que corresponde a sua força ao agarrar, “pinna reflex”, à compressão dos dígitos das patas caudais e à imediata reação ao estímulo. Cada parâmetro recebe pontuação de 0 a 2, sendo 20 a pontuação máxima total que o animal pode receber, indicando a inexistência de sintomas clínicos.

### **3.6. Teste de reconhecimento de objetos**

O teste de reconhecimento de objetos é utilizado em modelos experimentais com roedores na avaliação de aspectos cognitivos, como a memória de curta e longa duração. É baseado na tendência natural dos animais em explorar preferencialmente objetos desconhecidos (133). O teste foi realizado em um campo aberto de 40 × 60 cm, delimitado por 4 paredes com 50 cm de altura. No primeiro dia (3 dpi) foi realizada a habituação, o animal foi cuidadosamente colocado no canto traseiro esquerdo do aparelho e o ambiente foi explorado por 5 min. No segundo dia (4 dpi), o animal foi devolvido ao aparelho, no qual havia dois objetos de mesmo formato, tamanho e cor (A1 e A2) para um tempo de exploração de 10 min. No dia seguinte (24 h depois) (5

dpi), avaliamos a memória de longo prazo e colocamos um novo objeto (B) em um tempo de exploração de 5 min. Resumidamente, a preferência exploratória foi definida como a porcentagem do tempo total de exploração gasto investigando um objeto familiar (A) ou um novo objeto (B), calculado para cada animal:  $TB/(TA + TB) \times 100$ ; Onde TA = tempo gasto explorando o objeto familiar A e TB = tempo gasto explorando o novo objeto B. A distância percorrida na arena do aparelho foi registrada como parâmetro da atividade locomotora. O software Anymaze (Stoelting Co., Wood Dale, IL, EUA) foi utilizado para a análise comportamental.

### **3.7. Procedimento para a preparação da *N*-(cumarin-3-il)cinamamida (M220)**

#### **3.7.1. Química**

Materiais de partida e reagentes foram obtidos de fornecedores comerciais (Sigma-Aldrich) e foram usados sem purificação adicional. O ponto de fusão (P.f.) não foi corrigido e foi determinado com um termopan Reichert Kofler ou em tubos capilares em um aparelho Büchi 510. Os espectros de  $^1\text{H}$  RMN (300 MHz) e  $^{13}\text{C}$  RMN e DEPT (75,4 MHz) foram registrados com um espectrômetro Bruker AMX usando  $\text{CDCl}_3$  como solvente. Os desvios químicos ( $\delta$ ) são expressos em partes por milhão (ppm) usando TMS como padrão interno. As constantes de acoplamento  $J$  são expressas em Hertz (Hz). As multiplicidades de spin são dadas como s (singleto), d (duplete) em (multiplete). A espectrometria de massa foi realizada com um espectrômetro Hewlett-Packard 5988A. A cromatografia flash (FC) foi realizada em sílica gel (Merck 60, 230-400 mesh); A TLC analítica foi realizada em placas de gel de sílica pré-revestidas (Merck 60 F254). As soluções orgânicas foram secas sobre sulfato de sódio anidro. A concentração e evaporação do solvente após a reação ou extração foi realizada em um evaporador rotativo (Büchi Rotavapor) operando sob pressão reduzida.

### 3.7.2. Preparação do precursor 3-nitrocumarina

A 3-nitrocumarina comercialmente disponível (Sigma-Aldrich) (1,0 mmol) foi dissolvida em etanol (10 mL). Paládio sobre carbono (Pd/C, quantidade catalítica) foi adicionado e a suspensão foi agitada em uma atmosfera de gás hidrogênio (H<sub>2</sub>) por 5 horas. O lote foi evaporado e purificado por cromatografia flash, usando hexano/acetato de etila (9:1), para dar a 3-aminocumarina com 95% de rendimento.

### 3.7.3. Procedimento geral para a preparação de 3-amidocumarinas

A uma mistura de 3-aminocumarina (1,0 mmol) e piridina (1,1 mmol) em diclorometano (5 mL), foi adicionado cloreto de cinamoíla (1,1 mmol) gota a gota, a 0°C, com agitação constante. A mistura de reação foi agitada de 0°C até a temperatura ambiente durante a noite. Após terminar a reação (comprovado por cromatografia de capa fina), a mistura foi então primeiro basificada com NaHCO<sub>3</sub> saturado, e depois extraída com acetato de etila e água. As porções orgânicas foram combinadas e secas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro e filtradas, e o solvente foi evaporado para dar um produto bruto. O resíduo então purificado por cromatografia flash, usando hexano/acetato de etila (9:1), para dar a *N*-(cumarin-3-il)cinamamida (M220) com rendimento de 59% [30]. P.f.: 215 °C. <sup>1</sup>H RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), *J* (Hz): 6.68 (d, 1H, *J*=15.6, CH), 7.31-7.63 (m, 9H, ArH), 7.81 (d, 1H, *J*=15.6, CH), 8.34 (s, 1H, NH), 8.88 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C RMN (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 116.6, 120.3, 122.5, 124.4, 125.5, 125.7, 128.6, 129.7, 130.4, 130.7, 135.4, 141.9, 150.4, 158.2, 165.8. DEPT (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 116.6, 122.5, 124.4, 125.7, 128.6, 129.7, 130.4, 130.7, 141.9. EI-MS *m/z* (%): 291.

### 3.8. Tratamentos

Os animais foram infectados conforme descrito acima e, após três dias de infecção, quando a parasitemia tornou-se detectável na corrente sanguínea, foram tratados com o composto M220 (10 mg/kg – dose utilizada para tratamentos *in vivo* sem efeito tóxico em camundongo como inibidor seletivos da MAO-B (134)) ou cloroquina (CQ) (30 mg/kg (82,128)) uma vez ao dia, diluído em carboximetilcelulose 0,5% ou carboximetilcelulose 0,5% apenas, respectivamente, administrados por via oral por gavagem. Os animais tratados com o composto M220 e/ou CQ foram tratados por 10 dias.

### 3.9. Espirometria

Os camundongos foram infectados como descrito anteriormente (item 3.2 do Material e métodos). Os animais receberam uma injeção subcutânea de anestesia com associação de xilazina (12,5 mg/kg, Syntec do Brasil Ltda, Brasil) e cetamina (100 mg/kg, Syntec do Brasil Ltda) por via subcutânea e foram submetidos a espirometria invasiva (Buxco Research Systems, Wilmington, NC, USA) (135). Sob respiração mecânica, o volume corrente (VC), a complacência dinâmica (C<sub>dyn</sub>) e a resistência pulmonar (R<sub>p</sub>) foram determinados por meio de testes de resistência e complacência. Para medir a complacência estática (C<sub>st</sub>) e o pico de complacência (PC), os pulmões foram inflados a uma pressão padrão de +30 cm H<sub>2</sub>O e então exalados lentamente até atingir uma pressão negativa de -30 cm H<sub>2</sub>O. O C<sub>st</sub> foi avaliado a +10 cm H<sub>2</sub>O e o CP foi determinado pela relação pressão/volume no pico. Capacidade vital forçada (CVF) e capacidade inspiratória (C<sub>i</sub>) foram registradas durante esta manobra. A manobra de volume de fluxo rápido foi realizada e os pulmões foram primeiro inflados a +30 cm H<sub>2</sub>O e imediatamente submetidos a uma pressão altamente negativa para

forçar a expiração até -30 cm H<sub>2</sub>O, e o volume expiratório forçado a 20 ms (VEF20) foi registrado.

### **3.10. Imunofenotipagem por citometria de fluxo**

#### **3.10.1. Isolamento de células do cérebro**

Camundongos infectados com *PbA* foram sacrificados em 5 dpi. Os cérebros foram então removidos e as células cerebrais totais e os infiltrados foram isolados. Em suma, os cérebros foram coletados e gentilmente homogeneizados com um bastão e proveta de vidro contendo Meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Cultilab-Materiais Para Cultura de Células Ltda. Brasil) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab-Materiais Para Cultura de Células Ltda. Brasil). Os homogenatos foram passados por um filtro de células de náilon (tamanho dos poros, 70 µm; Becton, Dickinson, San Jose, CA) e depois centrifugados a 400 × g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspensado em um gradiente de Percoll de 35% (Sigma-Aldrich) e depositado em um gradiente de Percoll de 70%. Após centrifugação (1.100 × g), a mielina foi aspirada do topo da camada de Percoll 35% e as células de interesse foram coletadas na camada limite, entre gradientes de 70% e 35%. As células foram então ressuspensas em meio RPMI 1640 contendo 5% de soro bovino fetal e contadas.

#### **3.10.2. Isolamento de células do pulmão**

Os pulmões desses mesmos animais foram retirados, os quais foram lavados cuidadosamente em solução de PBS para retirada do excesso de sangue. O tecido foi colocado em tubos de 2 mL contendo 300 µL de RPMI 1640 e cortados em pedaços menores com o auxílio de uma tesoura. O tecido cortado foi transferido para um tubo de 15mL contendo 5mL de solução de digestão (Colagenase C2139 SIGMA, 0,5

mg/ml e DNase I, 20 µg/mL), incubado por 45 minutos a 37°C sob agitação (200 rpm). Após a digestão, 1 mL de FBS foi adicionado para interromper a reação de digestão. A suspensão foi passada por uma peneira de células (70 µm) e as partes maiores restantes foram removidas. A solução foi centrifugada (300 g × 5 minutos, 10°C) para obter o pellet celular. O sedimento foi ressuspense em 5 mL de tampão de lise de amônia-cloreto-potássio (ACK) (Gibco) para lisar os glóbulos vermelhos restantes (RBCs). Para neutralizar a reação, foram adicionados 10mL de RPMI complementado com 10% de FBS. Seguido de centrifugação (300 g × 5 minutos, 10°C) para obter o pellet celular novamente.

### **3.10.3. Isolamento de células do baço**

Baços também foram removidos. Estes foram suavemente homogeneizados com um bastão e proveta de vidro contendo meio RPMI 1640 contendo 5% de soro fetal bovino. Os homogenatos foram passados por um filtro de células de nylon (tamanho dos poros, 70 µm; Becton, Dickinson, San Jose, CA) e depois centrifugados a 400 × g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspense em tampão ACK para lise de RBC. Após 4 min, o tampão é neutralizado com RPMI 1640 contendo 5% de soro fetal bovino e novamente centrifugado a 400 × g por 10 min. O sedimento foi ressuspense em meio RPMI 1640 contendo 5% de soro bovino fetal e as células viáveis foram contadas.

### **3.10.4. Marcação de células para citometria**

As células purificadas do cérebro, pulmão e baço passaram pelas mesmas etapas de marcação para citometria e foram plaqueadas e incubadas com Brefeldina A (10 µg/mL) (Invitrogen) por 3 h a 37°C na presença de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, foram adicionados 300 µL de PBS/BSA 1% (solução salina tamponada com fosfato e

soro fetal bovino 1%) e centrifugados a 355 × g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e PBS/BSA 1% Fc Block (Fc block - CD16/CD32) diluído 1/100 foi adicionado e incubado por 30 minutos. Combinações específicas de anticorpos foram adicionadas às células para marcação de moléculas de superfície celular para CD3, CD11b (APC-Cy7); CD4, Ly6C (PE-Cy7); CD8, Ly6G, SinglecF (BV421); CD25, CD45 (PerCP-Cy5.5); F4/80 (FITC); CD11c (V500) e controles de isotipo (todos da BD Biosciences). Após a coloração, as células foram lavadas com 300 µL de PBS/BSA 1% e centrifugadas a 355 × g por 5 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram removidos e os pellets celulares foram ressuspensos em 200 µL de tampão de fixação (formaldeído a 2%) e incubados por 30 minutos. Após a fixação, as células foram lavadas com 300 µL de PBS/BSA 1% e centrifugadas a 355 × g por 5 minutos. Tampão de permeabilização (200 µL) (Bioscience) foi adicionado e as células foram incubadas por 30 minutos no escuro e posteriormente centrifugadas a 355 × g por 5 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram cuidadosamente removidos e os coquetéis de anticorpos específicos para coloração intracelular foram então adicionados IFN $\gamma$  (Alexa 488); IL-17A (PE), FOXP3 (PE), TNF (PE); IL-10 (APC) e as células foram incubadas por 45 minutos em temperatura ambiente. As células foram ainda lavadas com 300 µL de PBS/BSA 1% seguido de centrifugação a 355 × g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos e as células sedimentadas foram ressuspensos em 200 µL de PBS/BSA 1% para análise por citometria de fluxo. Um total de 30.000 células (eventos) foram adquiridos usando um citômetro FACS Canto II (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e analisados usando o software FlowJo (versão 10 - Tree Star, Ashland, Oregon, USA) com as seguintes estratégias de separação dos grupos celulares: imunidade inata na **Figura 1** e para as células da imunidade adquirida na **Figura 2**.

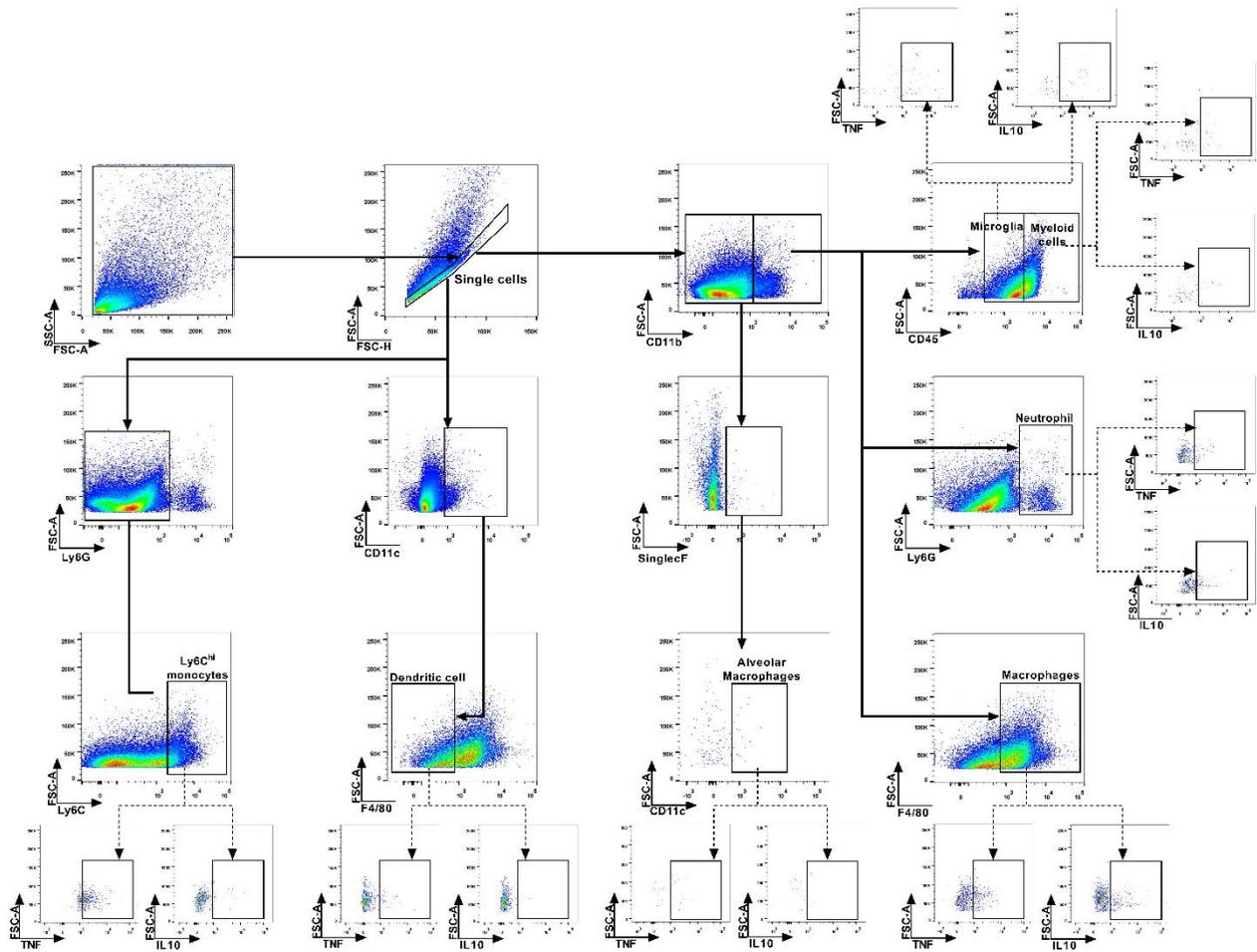
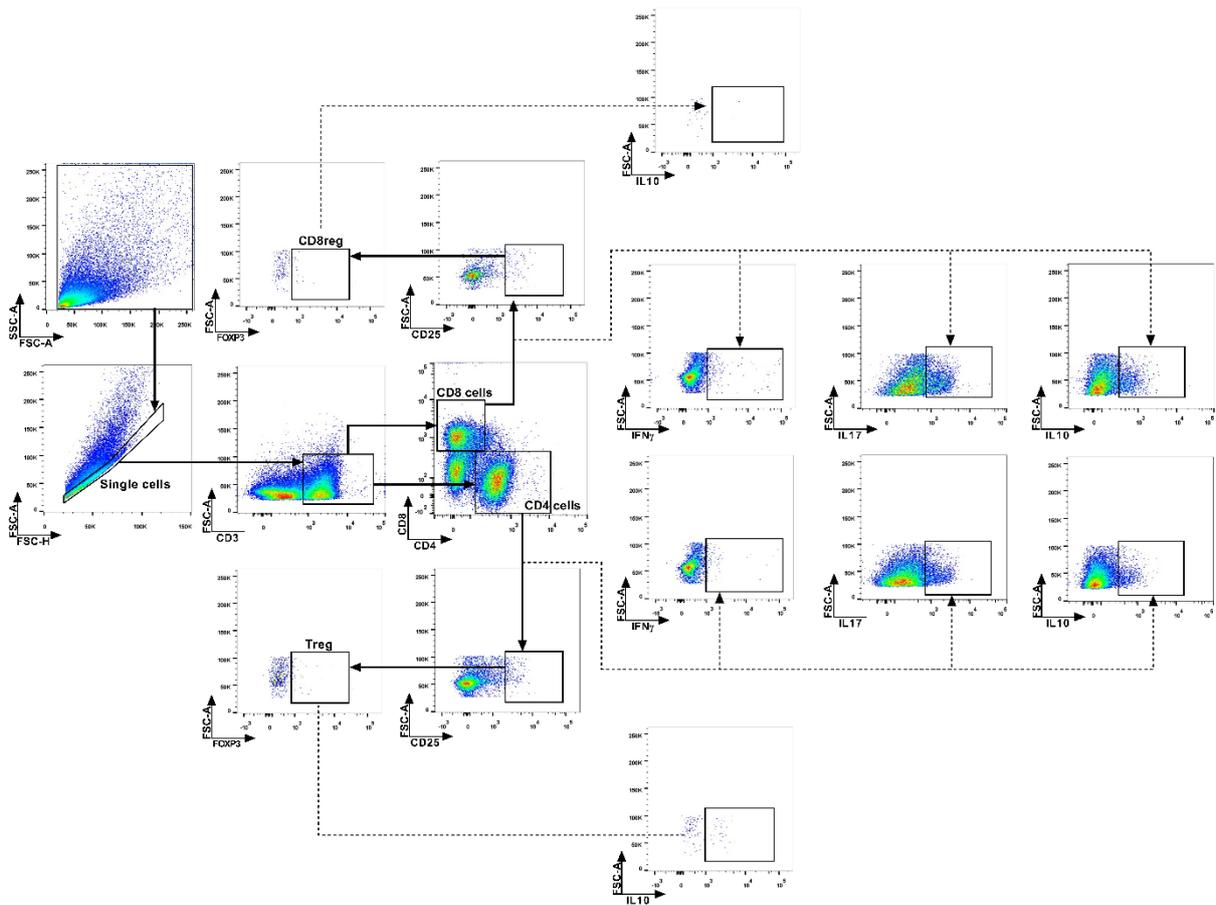


Figura 1. Estratégia de Gate para células da imunidade inata



**Figura 2. Estratégia de Gate para células da imunidade adaptativa**

### 3.11. Análise Histopatológica e Morfométrica

Após procedimentos mecânicos, os camundongos foram eutanasiados. O pulmão e o cérebro foram removidos e imediatamente fixados em formalina tamponada a 4% após 72h. Após esse tempo, o formol foi lavado com soro fisiológico e acondicionado em álcool 70%. O processamento e inclusão em parafina foram feitos com passagens subsequentes em etanol em diferentes concentrações (80%, 90%, absolutos 1, 2 e 3 – 30 minutos cada), xileno (1, 2 e 3 – 30 minutos cada). Foram realizados três cortes por pulmão (5µm) e feitos em lâminas de vidro, posteriormente corados com Hematoxilina de Harris (14 segundos) e Eosina (14 segundos) e examinados ao microscópio de luz. Os cortes foram capturados com uma câmera digital (Samsung SM-G9650 – f/2.4, 1/120, 4.30 mm, ISO100) acoplada a um

microscópio (IX70; Olympus, Center Valley, PA) com ampliação de 4x, 20x e 40x. Todas as ampliações foram multiplicadas por 2 devido à câmera acoplada ao microscópio. Dez imagens aleatórias de cada três cortes produzidos por pulmão foram adquiridas em 80x para contagem do infiltrado celular. Para a análise semiquantitativa, as lâminas foram examinadas em microscópio óptico de campo claro acoplado a um sistema digital de captura de imagens (Motic 2.0).

Os fragmentos pulmonares foram examinados para pontuar a inflamação das vias aéreas, inflamação perivascular, inflamação do parênquima e presença de hemorragia, 20 imagens aleatórias por animal foram capturadas com ampliação de 20X. A pontuação foi baseada na metodologia descrita anteriormente por (136). Onde a pontuação é baseada em 6 graus para inflamação das vias aéreas sendo: grau 0 ausência de células inflamatórias ao redor das vias aéreas (ausente); grau 1 algumas vias aéreas têm um pequeno número de células (discreto); grau 2 algumas vias aéreas apresentam inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria das vias aéreas apresenta alguma inflamação (acentuada); grau 4, a maioria das vias aéreas está significativamente inflamada (intensa); grau 5 todas as vias aéreas estão completamente inflamadas (grave). A pontuação também foi baseada em 6 graus para inflamação perivascular: no grau 0 ausência de células inflamatórias ao redor dos vasos (ausente); no grau 1 alguns vasos apresentam pequeno número de células inflamatórias (discreto); no grau 2, alguns vasos apresentam inflamação significativa (moderada); grau 3 a maioria dos vasos apresenta alguma inflamação (acentuada); grau 4 A maioria dos vasos está significativamente inflamada (intensa); grau 5 todos os vasos estão completamente inflamados (grave). Da mesma forma, o escore para inflamação do parênquima foi baseado em 6 graus, com grau 0 igual a menos de 1% do parênquima acometido; grau 1 de 1 a 9% do parênquima acometido; grau 2 de 10

a 29% do parênquima acometido; grau 3 de 30 a 49% do parênquima acometido; grau 4 de 50 a 69% do parênquima acometido; grau 5 para mais de 70% do parênquima afetado.

Os fragmentos cerebrais foram submetidos a análise histopatológica quanto a congestão, hemorragia parenquimatosa e infiltração celular. A análise morfométrica foi feita a partir de adaptações da metodologia descrita anteriormente por (136). Para a quantificação do infiltrado inflamatório, foram digitalizadas 20 imagens randomizadas do córtex cerebral em aumento de 40x, onde o infiltrado foi identificado e quantificado manualmente com auxílio de um cursor.

### **3.12. Análise estatística**

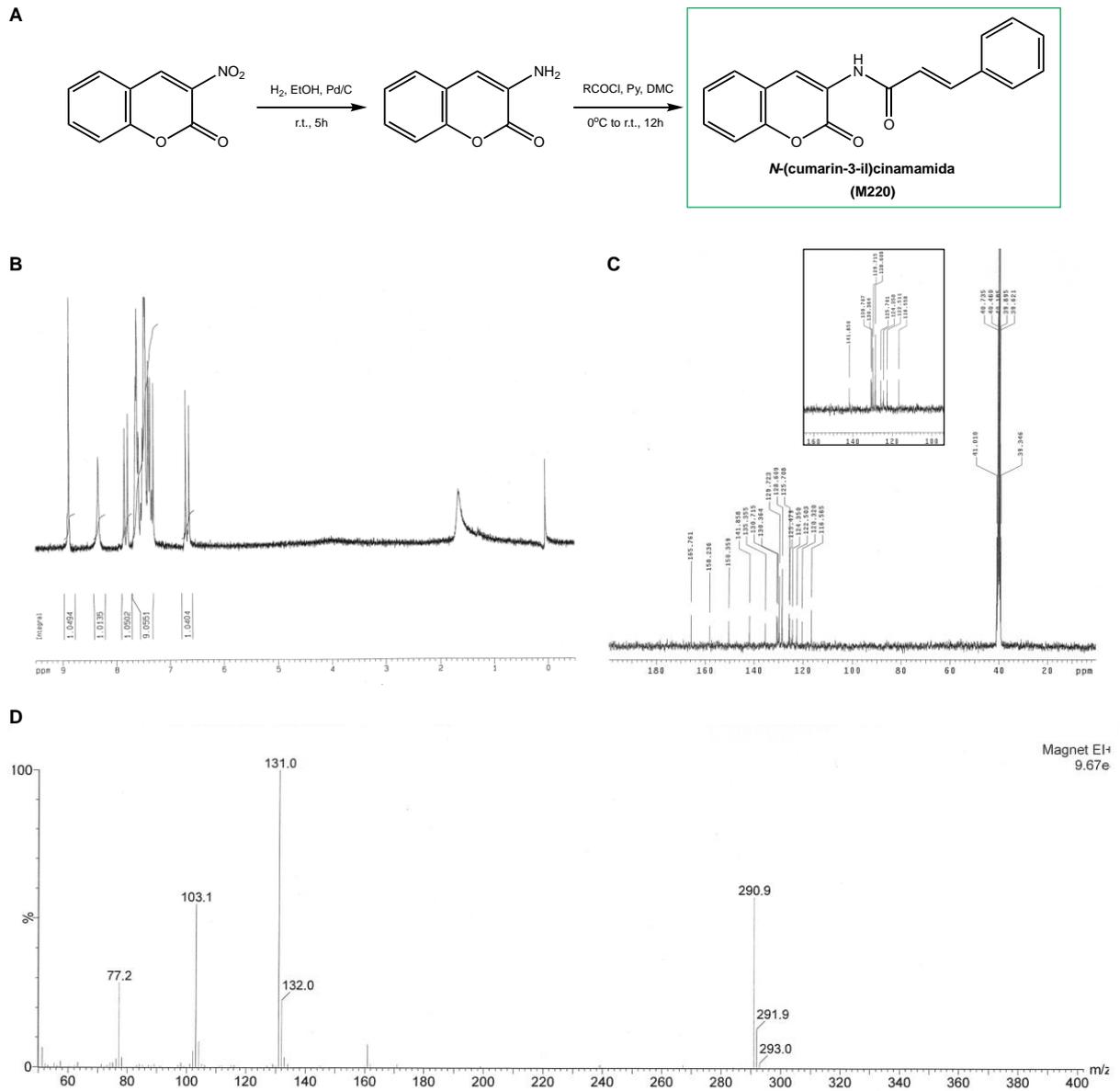
A significância estatística foi avaliada usando GraphPad Prism Software 8.0. Foram utilizados o teste t de Student, análise de variância (ANOVA) de uma via, pós-teste de comparações múltiplas de Tukey, ANOVA de duas vias e pós-teste de comparações múltiplas de Sidak, conforme descrito na legenda de cada figura. Os dados são representados como a média  $\pm$  SEM com significância considerada em  $p \leq 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Inc.).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Química

A síntese da cumarina estudada (M220) foi realizada em duas etapas diferentes (137). A primeira inclui a redução do grupo nitro da 3-nitrocumarina comercialmente disponível em atmosfera de hidrogênio, na presença de etanol e catalisador de paládio, à temperatura ambiente, por cinco horas. Após a redução do grupo nitro à amina correspondente, a segunda etapa envolve uma reação de amidação usando cloreto de cinamoíla, piridina e diclorometano, de zero graus Celsius à temperatura ambiente, agitando durante a noite.

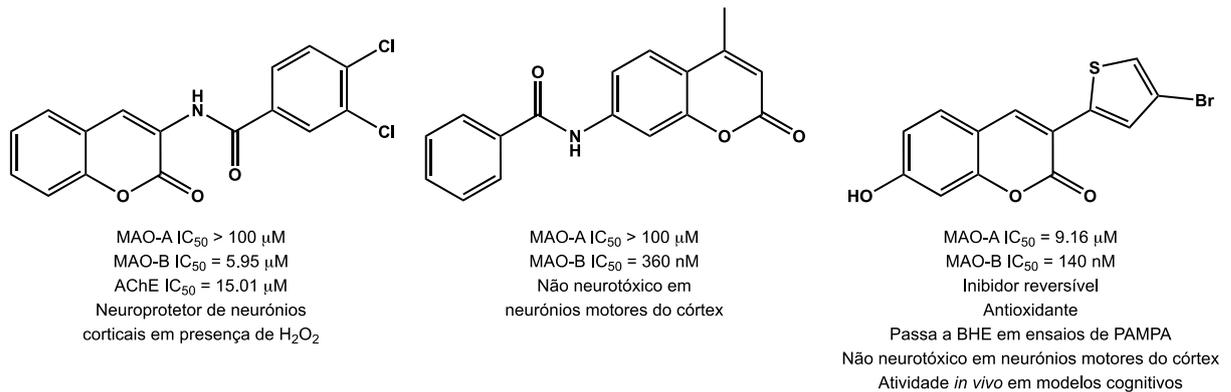
Depois de completar este protocolo, o produto final (M220, **Figura 3**) foi então caracterizado por  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  RMN e espectroscopia de massa. Em particular, os picos obtidos por  $^1\text{H}$  RMN nos ajudaram a elucidar a estrutura química. A presença de um singuleto largo em 8.34 ppm é compatível com o próton de nitrogênio do grupo amina. Além disso, a presença de um duplete em 6.68 ppm, com constante de acoplamento de 15.6 Hz, é compatível com o hidrogênio da dupla ligação contígua ao grupo carbonila da amina, de um isômero *trans*.



**Figura 3. A síntese de *N*-(cumarin-3-il)cinamamida) (M220) (137)**

Para chegar a selecionar este composto e prepará-lo em grande escala para ter a quantidade necessária na pureza requerida para os estudos *in vivo*, primeiro foi feita uma triagem rápida de vários compostos fenólicos sintetizados no grupo da Prof. Maria João Matos, na Faculdade de Farmácia da Universidade de Santiago de Compostela (exemplos na **Figura 4**). Todos esses compostos, estudados inicialmente *in vitro*, foram selecionados com base nas suas diversidades estruturais, tendo em

conta que todos eles apresentam os requisitos de terem atividades antioxidantes e neuroprotetoras já comprovadas, juntamente com a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e chegar ao cérebro. Posteriormente, os compostos do tipo fenólico foram estudados no sangue de camundongos WT infectados, como descrito anteriormente (item 2.2). O sangue periférico desses animais foi colhido após 7 dias de infecção (dpi), alíquotado em tubos e incubado a temperatura ambiente com os diferentes compostos. Uma alíquota contendo apenas sangue e uma incubada com CQ foram feitas para fins de controle. Após 1h, o sangue foi levado a leitura em citometria de fluxo para análise da porcentagem de fluorescência de parasitos presentes nas hemácias como já descrito anteriormente (item 2.3). A escolha do melhor candidato foi com base na maior porcentagem de hemácias vivas assim como a menor porcentagem de fluorescência GFP (FITC) que correspondia diretamente a presença do PbA. De todos os compostos da triagem, o composto M220 provou ser o mais interessante para seguir para os estudos *in vivo* nos modelos de malária grave. Esta molécula foi elencada como a melhor dentre as demais moléculas por manter alta a porcentagem de hemácias vivas (94,6%) e reduzir a porcentagem de hemácias contendo *Plasmodium* GFP de 46% para 27,8%. Uma redução de 78% maior se comparada aos resultados obtidos com CQ (46% para 35,8%). Desta forma, depois de conhecer o perfil antioxidante e neuroprotetor das moléculas em estudo, escolhemos, com base nos critérios de redução de parasitemia e sobrevivência celular, o composto M220 para os testes *in vivo*.



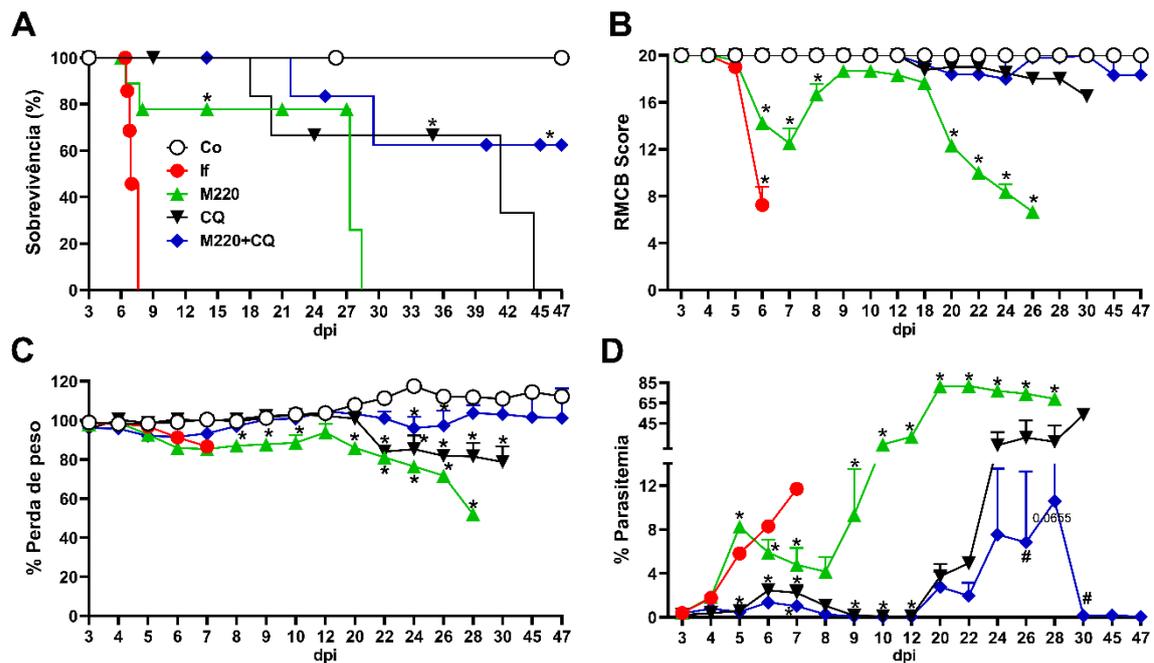
**Figura 4. Exemplos de alguns dos compostos estudados na triagem *in vitro* inicial, prévia à seleção do composto M220**

Assim, de uma família de compostos fenólicos, o composto M220 foi selecionado. Por apresentar uma estrutura de tipo amida, foram realizados estudos de estabilidade em meio fisiológico, usando diferentes buffers, a diferentes pHs. Também, foram incubadas as amostras a diferentes temperaturas desde a temperatura ambiente (20°C) até 37°C. Em todas as condições estudadas, o composto provou ser estável, não sendo observados sinais de degradação ou metabolização.

#### **4.1. Tratamento com o composto M220 protege camundongos da mortalidade e controla a parasitemia de forma mais eficiente que o antimalárico sozinho**

Tendo em vista esses achados químicos e suas potenciais atividades biológicas, foi proposta a investigação dos efeitos do tratamento com o composto M220 durante a infecção por *PbA*. Parâmetros gerais e primários foram analisados, como sobrevivência, pontuação de RBMC, perda de peso e parasitemia. O início do tratamento dos animais deu-se no 3<sup>o</sup> dpi. Este é o momento em que os camundongos apresentam parasitemia, mas geralmente sem envolvimento neurológico. Os achados aqui apresentados demonstram que camundongos tratados apenas com M220 tiveram um aumento de quatro vezes no tempo de sobrevida em comparação com o

grupo infectado não tratado (**Figura 5A**). O tratamento com a combinação de M220 e CQ (M220+CQ) mostrou-se moderadamente mais eficaz, aumentando significativamente em cinco vezes a sobrevida média da infecção por PbA (**Figura 5A**). O score clínico (RMCBs) foi utilizada a fim de detectar alterações comportamentais e neurológicas durante a infecção por PbA. Após a interrupção do tratamento no dia 12<sup>o</sup>, aos 20<sup>o</sup> dpi, a pontuação clínica dos camundongos tratados com M220 apresentou piora quando comparado aos demais grupos tratados; os camundongos tratados com M220+CQ continuaram a exibir pontuações clínicas superiores em comparação com as pontuações dos camundongos nos outros grupos de tratamento (**Figura 5B**). Além disso, foi encontrada perda de peso de maneira significativa nos animais dos grupos tratados com o composto M220 ou CQ (**Figura 5C**). Já nos camundongos tratados com M220+CQ apresentaram perda de peso reduzida em comparação com os demais grupos tratados (**Figura 5C**). A **Figura 5D** mostra que o tratamento com M220+CQ possui maior eficácia no controle da parasitemia se comparada a cada tratamento separadamente se comparados.

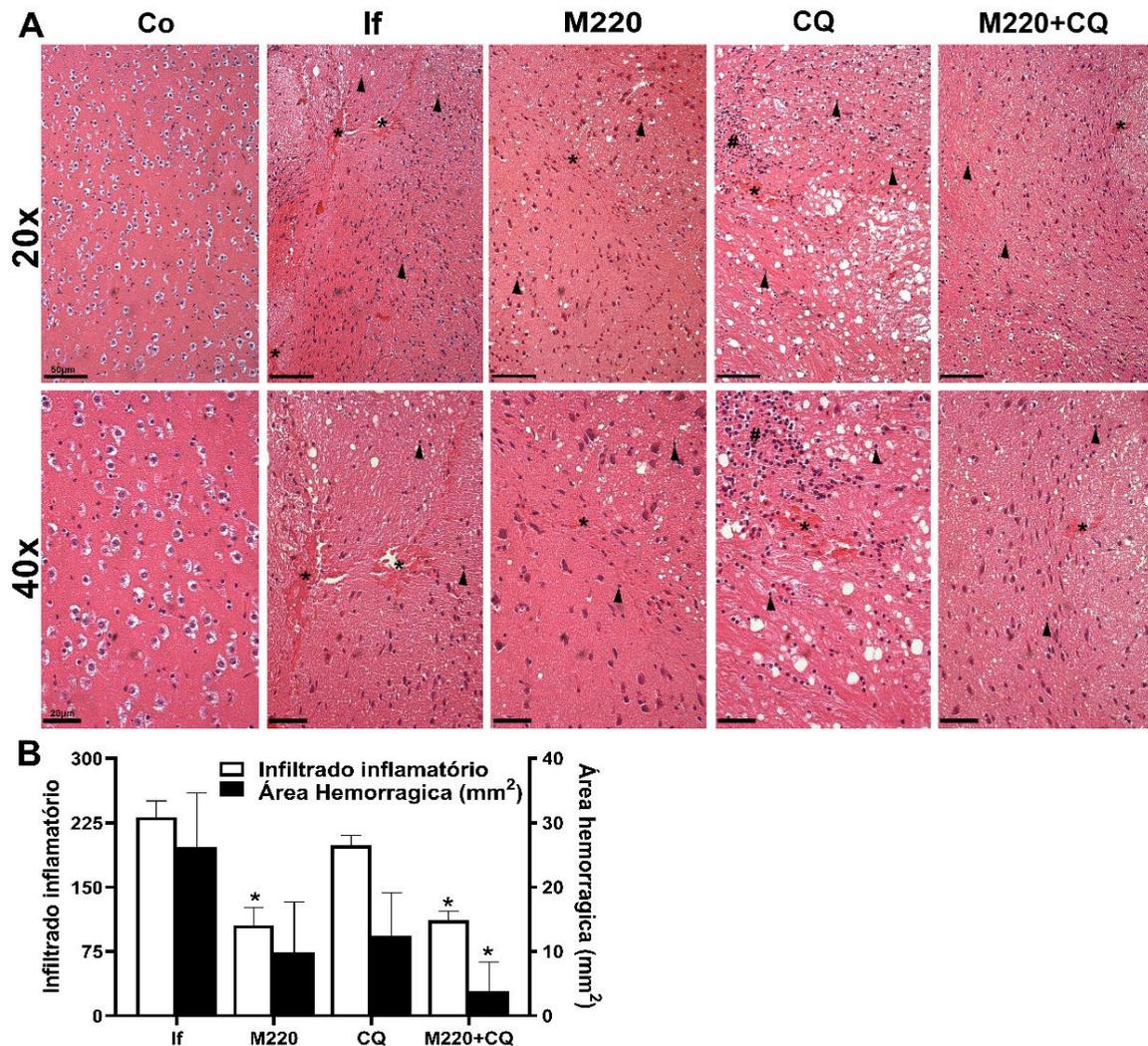


**Figura 5. Tratamento com o composto M220 protege camundongos da mortalidade e controla a parasitemia de forma mais eficiente que o antimalárico sozinho**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados por via intraperitoneal (i.p.) com  $1 \times 10^5$  eritrócitos parasitados com PbA. Os camundongos foram tratados com composto M220 (10 mg/kg) e/ou CQ (30 mg/kg) via gavagem uma vez por dia de 3<sup>o</sup> ao 12<sup>o</sup> dpi. Os seguintes grupos de animais foram gerados: camundongos não infectados (Co) que receberam apenas o veículo, camundongos infectados (If) que receberam apenas o veículo, (M220) camundongos infectados e tratados com M220, (CQ) camundongos infectados e tratados com CQ e (M220+CQ) camundongos infectados e tratados com M220+CQ. Os seguintes parâmetros foram avaliados: (A) sobrevida, (B) escore clínico usando o parâmetro Rapid Murine Coma and Behavior Scale-RBMC; (C) perda de peso; (D) parasitemia. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (4-6 camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando análise de variância One-way ANOVA com Dunnett's como pós-teste, two-way ANOVA com Sidak's como pós-teste e teste de log-rank (Mantel-Cox). # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. # ou \*  $p < 0,05$ .

#### **4.2. Tratamento com o composto M220 reduz a lesão cerebral em camundongos infectados com PbA**

Ao ser avaliado o córtex cerebral dos animais nos grupos infectados e tratados com CQ, foi observado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear caracterizado por linfócito (**Figura 6A e B**) e frequentemente observado a presença de vasos congestos (**Figura 6A**). Nos cérebros de animais infectados também foram observadas extensas áreas hemorrágicas (**Figura 6B**). Quando tratados com M220 ou com a combinação de M220+CQ foram observados no córtex cerebral, discreto infiltrado linfocitário, pequenos vasos congestos e significativa redução de áreas hemorrágicas (**Figura 6A e B**) mostrando eficácia desses tratamentos no controle da inflamação cerebral.

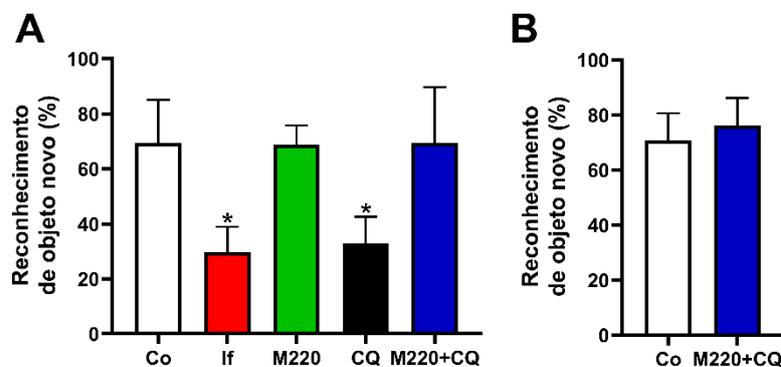


**Figura 6. Tratamento com o composto M220 reduz a lesão cerebral em camundongos infectados com PbA**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na Figura 1. Os animais foram sacrificados no 5º dpi e o cérebro foi removido para confecção de lâminas histológicas: (A) fotomicrografias representativas de cortes cerebrais corados com H&E (aumento de 20x e 40x); cortes de um camundongo não infectado com aparência histológica normal (Co) e (If) camundongos infectados com PbA mostrando múltiplos infiltrados inflamatórios (seta), áreas de sangramento (asteriscos) e focos inflamatórios (hashtag) no 5º dpi. As barras na imagem representam 50 µm. (B) área hemorrágica (mm<sup>2</sup>) do tecido cerebral. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (4-6 camundongos/grupo) sendo apresentados como a média ± SEM. A análise estatística foi realizada usando análise de variância One-way ANOVA com Dunnett's como pós-teste, two-way ANOVA com Sidak's como pós-teste e teste de log-rank (Mantel-Cox). \*  $p < 0,05$ .

### 4.3. M220 preserva eficientemente a capacidade de formação de memória em camundongos infectados por PbA

Tendo em vista as análises do tecido cerebral e os danos nele observados, é fundamental importância observar a capacidade cognitiva dos animais. O teste de reconhecimento de objetos novo mostrou que os camundongos infectados, não tratados ou tratados com somente CQ, perderam significativamente a capacidade de formar memória ao 5º dpi (**Figura 7A**). Em contraste, camundongos tratados com M220 ou M220+CQ mostraram capacidade total de reconhecer o novo objeto, semelhante aos camundongos controle não infectados (**Figura 7B**). Notavelmente, representantes dos grupos controle e infectados tratados com M220+CQ ainda vivos após 45 dpi foram submetidos novamente ao novo teste de reconhecimento de objetos, demonstrando capacidade cognitiva preservada.

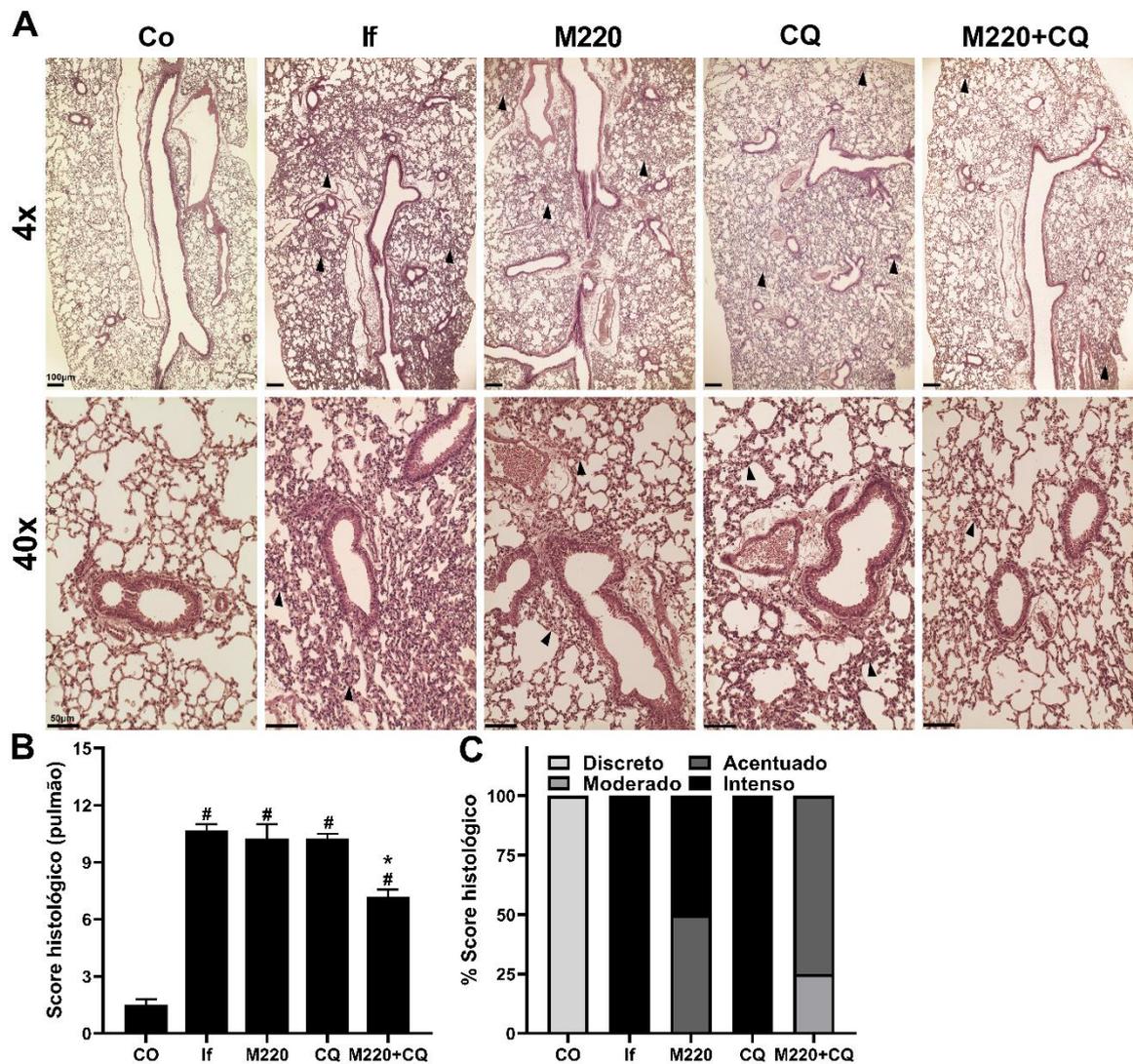


**Figura 7. M220 preserva eficientemente a capacidade de formação de memória em camundongos infectados por PbA**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na Figura 1. Avaliação cognitiva por meio de teste de reconhecimento de objetos realizado no 5º (**A**) e 47º (**B**) dpi. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (4-6 camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando análise de variância (ANOVA) de uma via com pós-teste de Dunnett, ANOVA de duas vias com pós-teste de Sidak's e teste de log-rank (Mantel-Cox). \*  $p < 0,05$ .

#### **4.4. Tratamento com o composto M220 reduz lesões e inflamações no tecido pulmonar em camundongos infectados com PbA**

Juntamente com o cérebro, os pulmões são os órgãos mais afetados, apresentando a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA), uma complicação presente na malária grave. A disfunção pulmonar afeta cerca de 20% dos casos de malária *P. falciparum* (57) e envolve processos inflamatórios (60). Portanto, levantou-se a hipótese de que os tratamentos também diminuiriam a inflamação pulmonar e reverteriam a disfunção pulmonar observada na malária grave. A avaliação histológica revelou infiltração celular aumentada e inflamação intensa, além de inflamação peribrônquica, perivascular e parenquimal intensa em camundongos não tratados, infectados com PbA no 6º dpi (**Figuras 8A-C**). Quando tratados com CQ, não se observam melhoras em comparação aos animais infectados. Por outro lado, os camundongos do grupo tratado com M220 ou M220+CQ mostraram inflamação peribrônquica, perivascular e parenquimal moderada. No grupo tratado com M220+CQ, além da inflamação reduzida, o escore histológico encontra-se diminuído (**Figura 8B**).



**Figura 8. Tratamento com o composto M220 reduz lesões e inflamações no tecido pulmonar em camundongos infectados com PbA**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na Figura 1. (A). Fotomicrografias representativas de seções pulmonares coradas com H&E (ampliação de 4x e 40x); cortes de um camundongo não infectado com aparência histológica normal (Co) e (If) camundongos infectados com PbA mostrando espessamento dos septos alveolares (seta) no 6º dpi. Notavelmente, o tratamento com M220+CQ reduziu a lesão pulmonar observada no 6º dpi. As barras na imagem representam 50  $\mu$ m. (B) escore histológico do tecido pulmonar (C) análise descritiva dos parâmetros histopatológicos do 6º dpi. Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (4-6 camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando a variância One-way ANOVA com Tukey como pod-teste e o teste t de

Student's *t*. # para comparação de grupos de controle vs. grupo infectado; \* para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ. \* ou #  $p < 0,05$ .

#### 4.5. Administração de M220 atenua a disfunção mecânica pulmonar durante a infecção por PbA em camundongos

Foi realizada a espirometria forçada a fim de verificar essa função vital e observar se os nossos tratamentos exerciam influências sobre ela. A avaliação da função pulmonar mostrou um reflexo de inflamação tecidual e lesão pulmonar, levando a disfunção mecânica evidente com R<sub>p</sub> acentuadamente aumentada, com perda de todas as complacências analisadas (C<sub>st</sub>, C<sub>dyn</sub> e PC), redução do fluxo das vias aéreas (VEF<sub>20</sub>) e baixos volumes pulmonares (CVF, C<sub>i</sub> e VC) em camundongos não tratados, infectados com PbA. O tratamento com M220 ou CQ resultou em melhora discreta da função pulmonar. No entanto, o tratamento com M220+CQ melhorou fortemente a função pulmonar, que se normalizou em 5 e 6 dpi (Figuras 9A–H).

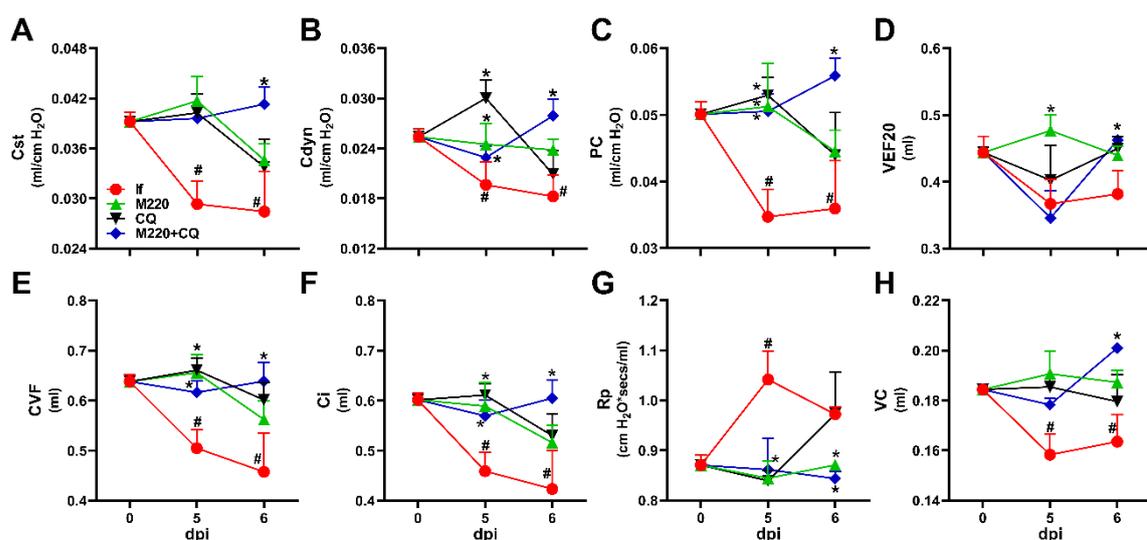


Figura 9. Administração de M220 atenua a disfunção mecânica pulmonar durante a infecção por PbA em camundongos

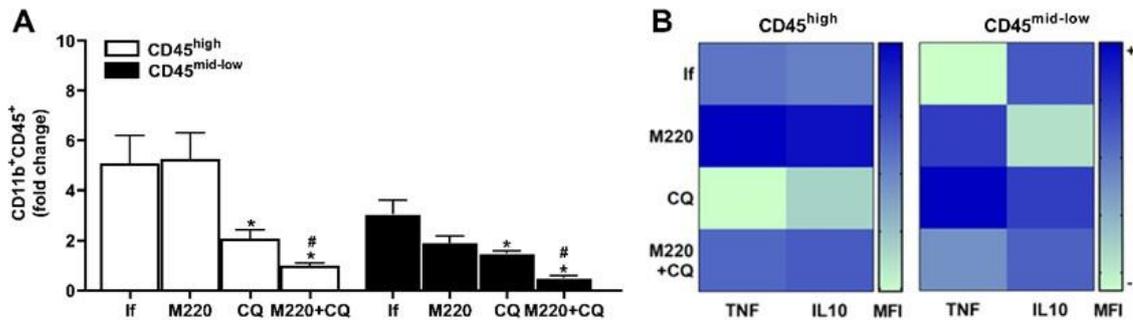
Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na Figura 1. Aos 5<sup>o</sup> e 6<sup>o</sup> dpi, os camundongos foram anestesiados, traqueostomizados, colocados em um pletismógrafo corporal e conectados a um ventilador controlado por computador. **(A)** complacência estática (Cst), **(B)** complacência dinâmica (Cdyn), **(C)** pico de complacência (PC), **(D)** volume expiratório forçado em 20 ms (VEF20), **(E)** capacidade vital forçada (CVF); foram analisados **(F)** capacidade inspiratória (Ci), **(G)** resistência pulmonar (Rp) e **(H)** volume corrente (VC). Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (4-6 camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando a variância One-way ANOVA com Tukey como pod-teste e o teste t de Student's. # para comparação de grupos de controle vs. grupo infectado; \* para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ. \* ou #  $p < 0,05$ .

#### **4.6. Redução de células mieloides e micróglia e aumento da produção de IL-10 após o tratamento com M220 em camundongos infectados com PbA**

Em seguida, procuramos determinar se a modulação da inflamação cerebral e pulmonar era o mecanismo subjacente pelo qual o composto M220 exercia seu efeito protetor. Para tanto, foram avaliados os perfis celulares das respostas imunes nesses órgãos. Os camundongos foram infectados e tratados conforme descrito nas seções 2.2 e 2.4 dos Materiais e Métodos, sacrificados no 5<sup>o</sup> dpi, e o cérebro e o pulmão foram coletados, processados e as células recuperadas foram marcadas com anticorpos específicos (conforme descrito na metodologia) para análise de citometria de fluxo.

Os resultados mostraram que o número de células mieloides (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup>) e micróglia (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>mid-low</sup>) no cérebro diminuiu acentuadamente após o tratamento com CQ em camundongos infectados com PbA (**Figura 10A**). Notavelmente, o tratamento com M220+CQ foi ainda mais eficaz do que apenas com CQ, reduzindo ambos os subconjuntos de células no cérebro (**Figura 10A**). Além disso, o tratamento com M220+CQ aumentou a produção de IL-10 mais do que a produção de TNF por ambos os subconjuntos de células quando comparado com o

grupo que recebeu apenas tratamento com CQ, que apresentou níveis mais elevados de TNF do que IL-10 (**Figura 10B**).

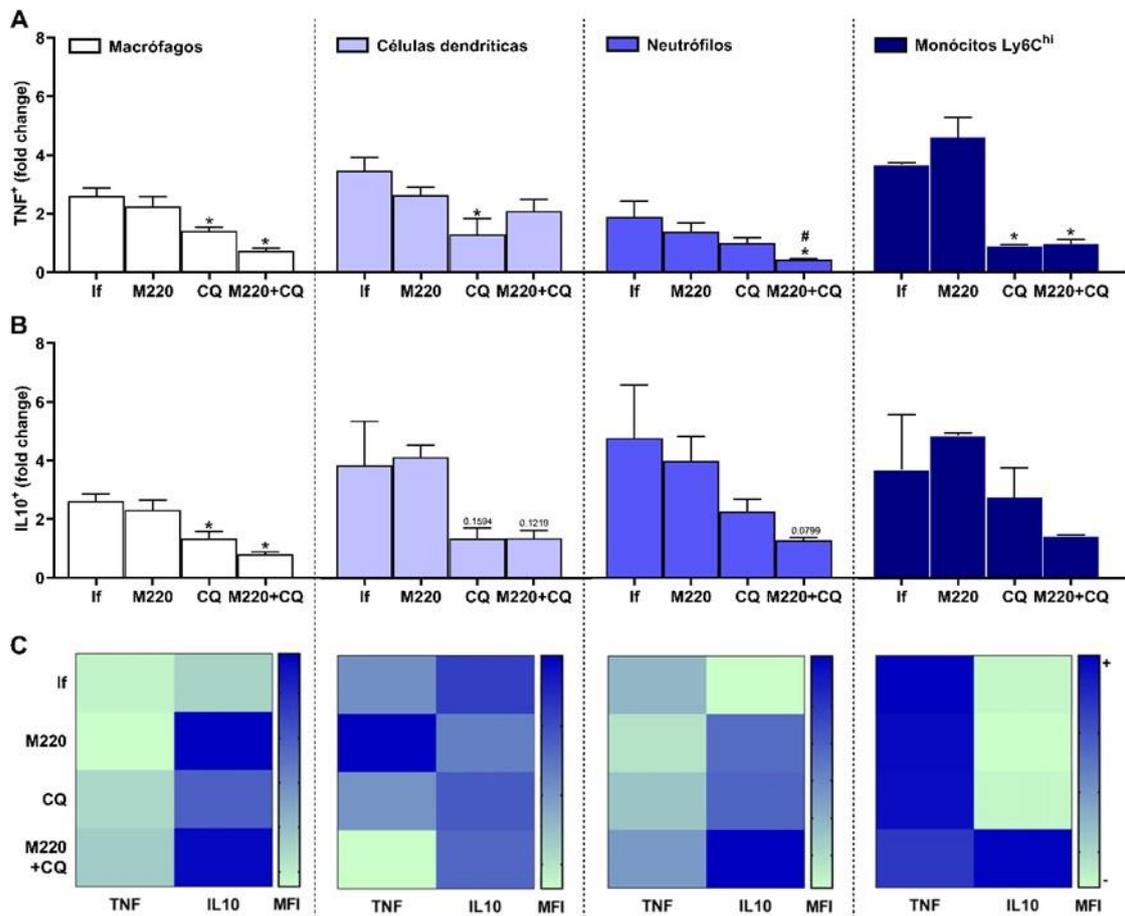


**Figura 10. Redução de células mieloides, micróglia e aumento da produção de IL-10 observado após o tratamento com M220 em camundongos infectados com PbA**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na Figura 1. Os camundongos foram sacrificados no 5º dpi, seus cérebros foram colhidos e homogeneizados, e as populações de células residentes e sequestradas foram analisadas por citometria de fluxo. **(A)** células CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup> e CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>mid-low</sup>. **(B)** Heat map representando a intensidade de fluorescência mediana (MFI) de TNF e IL-10 em CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>mid-low</sup>. Os dados apresentados nos gráficos representam valores dos números de células normalizados pelos animais controle não infectados (fold-change). Em todos os heat maps, a escala de cores corresponde aos níveis relativos de MFI para cada citocina analisada (dados apresentados em escala de cinza; preto indica níveis mais altos de MFI de citocina e branco indica níveis mais baixos de MFI de citocina). Os dados são representativos de dois experimentos independentes (seis camundongos/grupo) sendo apresentados como a média ± SEM. As análises estatísticas foram realizadas usando One-way ANOVA com Tukey's como pós-teste, Two-way ANOVA com Sidak's como pós-teste e o teste t de Student's. # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. \* ou # p < 0,05.

#### **4.7. Grupos tratados com CQ e M220+CQ apresentaram no cérebro números reduzidos de macrófagos positivos para IL-10, porém elevado o nível de produção de IL-10**

Também foram investigadas as células da imunidade inata que infiltraram no tecido cerebral durante a infecção por PbA. Os resultados demonstram números reduzidos de macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup> produtores de TNF (**Figura 11A**) e IL-10 (**Figura 11B**), encontrados nos grupos CQ e M220+CQ quando comparados aos apenas infectados. Ao investigarmos os níveis de produção das citocinas (MFI) é possível notar a eficiência de M220+CQ em induzir níveis mais elevados de IL-10 do que TNF, um ator essencial na imunorregulação, também foi observada nesses leucócitos (**Figura 11C**).



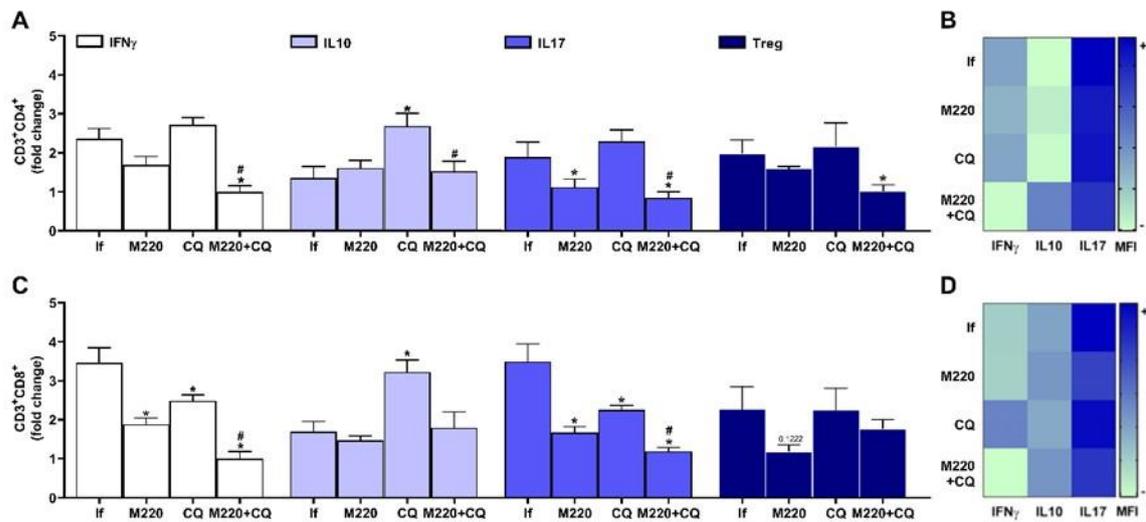
**Figura 11. Grupos tratados com CQ e M220+CQ apresentaram no cérebro números reduzidos de macrófagos positivos para IL-10, porém elevado o nível de produção de IL-10**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na Figura 1. Os camundongos foram sacrificados no 5º dpi, seus cérebros foram colhidos e homogeneizados, e as populações de células residentes e sequestradas foram analisadas por citometria de fluxo. (A, B) células CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (macrófagos), CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> (DCs), CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) e Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (monócitos Ly6C<sup>hi</sup>) positivos para TNF (A) e IL-10 (B). (C) Heat map representando o MFI de TNF e IL-10 em macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup>. Em todos os heat maps, a escala de cores corresponde aos níveis relativos de MFI para cada citocina analisada (dados apresentados em escala de cinza; preto indica níveis mais altos de MFI de citocina e branco indica níveis mais baixos de MFI de citocina). Os dados apresentados nos gráficos representam valores dos números de células normalizados pelos animais controle não infectados (fold-change). Os dados são representativos de dois experimentos independentes (seis camundongos/grupo) sendo apresentados como a média ± SEM. As análises estatísticas foram realizadas usando One-way ANOVA com Tukey's como pós-teste, Two-way ANOVA com Sidak's como pós-teste e o

*teste t de Student's. # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. \* ou #  $p < 0,05$ .*

#### **4.8. Camundongos infectados com PbA e tratados com M220 apresentam redução dos níveis de produção de IFN $\gamma$ e IL-17A por células Th1 e Th17, e aumento de IL-10**

Além disso, camundongos não tratados infectados com PbA apresentaram resposta Th1 e Th17 robusta (**Figura 12A**), produzindo IFN $\gamma$  e IL-17A (**Figura 12B**), respectivamente, com células Th2 e T regulatórias (Tregs) mais baixas e menos ativadas (**Figura 12A**) produzindo IL-10 (**Figura 12B**). Além disso, foi observado números aumentados de linfócitos T CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>IL-17<sup>+</sup> no grupo de animais infectado não tratado (**Figura 12C**). Por outro lado, camundongos infectados com PbA tratados com M220+CQ apresentaram respostas Th1 e Th17 diminuídas (**Figura 12A**), como também, níveis significativamente reduzidos de IFN $\gamma$  e IL-17A e aumento de IL-10 (**Figura 12B**) em comparação com o grupo de camundongos infectados não tratado. Esse mesmo comportamento de redução de células e produção de citocinas foi observado em linfócitos T CD8<sup>+</sup> do grupo M220+CQ quando comparados aos do grupo infectado não tratado (**Figuras 12C e D**).

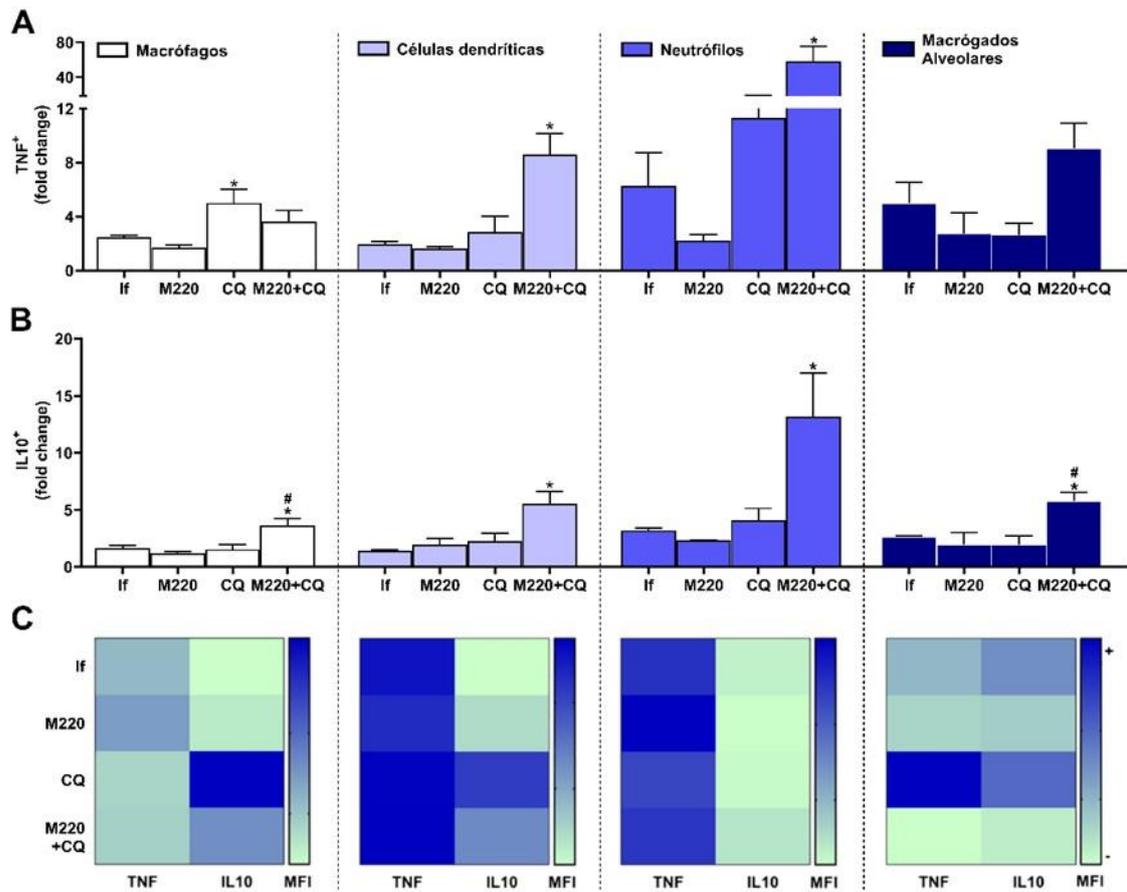


**Figura 12. Camundongos infectados com PbA e tratados com M220+CQ apresentam resposta Th1 e Th17 com produção de IFN $\gamma$  e IL-17A reduzida**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na Figura 1. Os camundongos foram sacrificados no 5<sup>o</sup> dpi, seus cérebros foram colhidos e homogeneizados, e as populações de células residentes e sequestradas foram analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> positivos para IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17A e Foxp3 (Treg). **(B)** Heat map representando MFI de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-17A em linfócitos CD4<sup>+</sup>. **(C)** Linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> positivos para IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17A e Foxp3 (Treg); **(D)** Heat map representando MFI de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-17A em linfócitos CD8<sup>+</sup>. Em todos os heat maps, a escala de cores corresponde aos níveis relativos de MFI para cada citocina analisada (dados apresentados em escala de cinza; preto indica níveis mais altos de MFI de citocina e branco indica níveis mais baixos de MFI de citocina). Os dados apresentados nos gráficos representam valores dos números de células normalizados pelos animais controle não infectados (fold-change). Os dados são representativos de dois experimentos independentes (seis camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. As análises estatísticas foram realizadas usando One-way ANOVA com Tukey's como pós-teste, Two-way ANOVA com Sidak's como pós-teste e o teste t de Student's. # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. \* ou #  $p < 0,05$ .

#### **4.9. Efeitos do tratamento com M220 durante a resposta inflamatória induzida por PbA nos pulmões**

Considerando os resultados de histologia e mecânica pulmonar, a citometria de fluxo do tecido pulmonar foi realizada para avaliar células da imunidade presentes neste órgão. A infecção por PbA induziu um aumento acentuado no número de células que liberam citocinas no pulmão. Três vezes mais para macrófagos produtores de TNF e DC, 5 a 7 vezes mais para neutrófilos e macrófagos alveolares produtores de TNF (**Figura 13A**). Além disso, embora em menor número do que as células TNF<sup>+</sup>, um número aumentado de macrófagos produtores de IL-10, DCs, neutrófilos e macrófagos alveolares foi encontrado nos pulmões após a infecção por PbA (**Figura 13B**). Embora o tratamento apenas com CQ tenha aumentado o número de macrófagos produtores de TNF (**Figura 13A**), reduziu os níveis de produção de TNF e aumentou os níveis de produção de IL-10 por essas células durante a infecção (**Figura 13C**). O tratamento com M220+CQ aumentou o número de DCs e neutrófilos positivos para TNF (**Figura 13A**), mas reduziu os níveis da produção de TNF pelos macrófagos alveolares (**Figura 13C**). Notavelmente, os resultados demonstram aumento no número de macrófagos, DCs, neutrófilos e macrófagos alveolares positivos para IL-10 (**Figura 13B**). Além disso, o tratamento com M220+CQ estimulou essas células, exceto os macrófagos alveolares, a produzir níveis aumentados dessa citocina anti-inflamatória quando comparado com camundongos não tratados infectados (**Figura 13C**).



**Figura 13. Efeitos do tratamento com M220 durante a resposta inflamatória induzida por PbA nos pulmões**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na legenda da Figura 1. Os camundongos foram sacrificados no 5º dpi, os pulmões foram colhidos e homogeneizados e as populações de células residentes e sequestradas foram analisadas por citometria de fluxo. (A, B)  $CD11b^+F4/80^+$  (macrófagos),  $CD11c^+F4/80^-$  (DCs),  $CD11b^+Ly6G^+$  (neutrófilos) e  $SinglecF^+CD11c^+$  (macrófagos alveolares) foram positivos para TNF (A) e IL-10 (B). (C) Heat map representando a intensidade de fluorescência mediana (MFI) de TNF e IL-10 em macrófagos, DCs, neutrófilos e macrófagos alveolares. Em todos os heat maps, a escala de cores corresponde aos níveis relativos do MFI para cada citocina analisada (dados apresentados em escala de cinza; preto indica níveis mais altos de MFI de citocina e branco indica os níveis mais baixos de MFI de citocina). Os dados apresentados nos gráficos representam valores dos números de células normalizados pelos animais controle não infectados (fold-change). Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (três camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando, usando One-way ANOVA com Tukey's como pós-

teste e o teste *t* de Student. # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. \* ou #  $p < 0,05$ .

#### 4.10. Camundongos infectados e tratados com M220+CQ têm um aumento de células positivas para IL-10 e IL-17A e de linfócitos Treg no pulmão

Os resultados também demonstram que as células da imunidade adaptativa de animais tratados com M220+CQ tiveram perfil alterado das células Th durante a infecção, aumentando as células positivas para IL-10 e IL-17A e os linfócitos Treg (Figura 14A). Além disso, o tratamento com M220+CQ resultou em níveis mais elevados de produção de IL-10 do que de IFN $\gamma$  e IL-17A por linfócitos T CD4 $^+$  e CD8 $^+$  (Figuras 14B e 14D). Para linfócitos CD8, observamos que quando os animais eram infectados e tratados com M220 ou M220+CQ, ocorreu um aumento do número de células positivas para IL-10 e células CD8reg (Figura 14C).

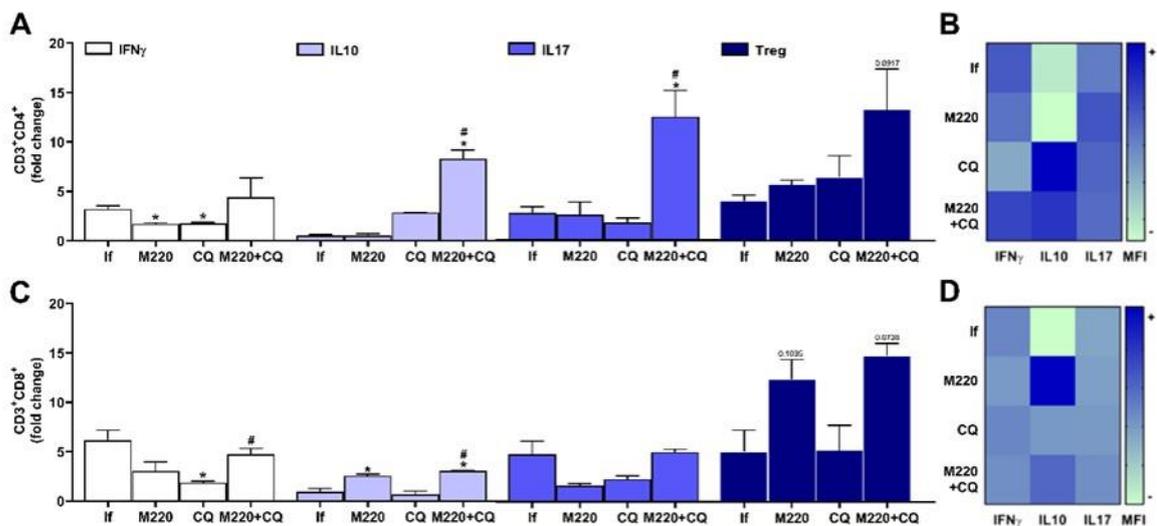


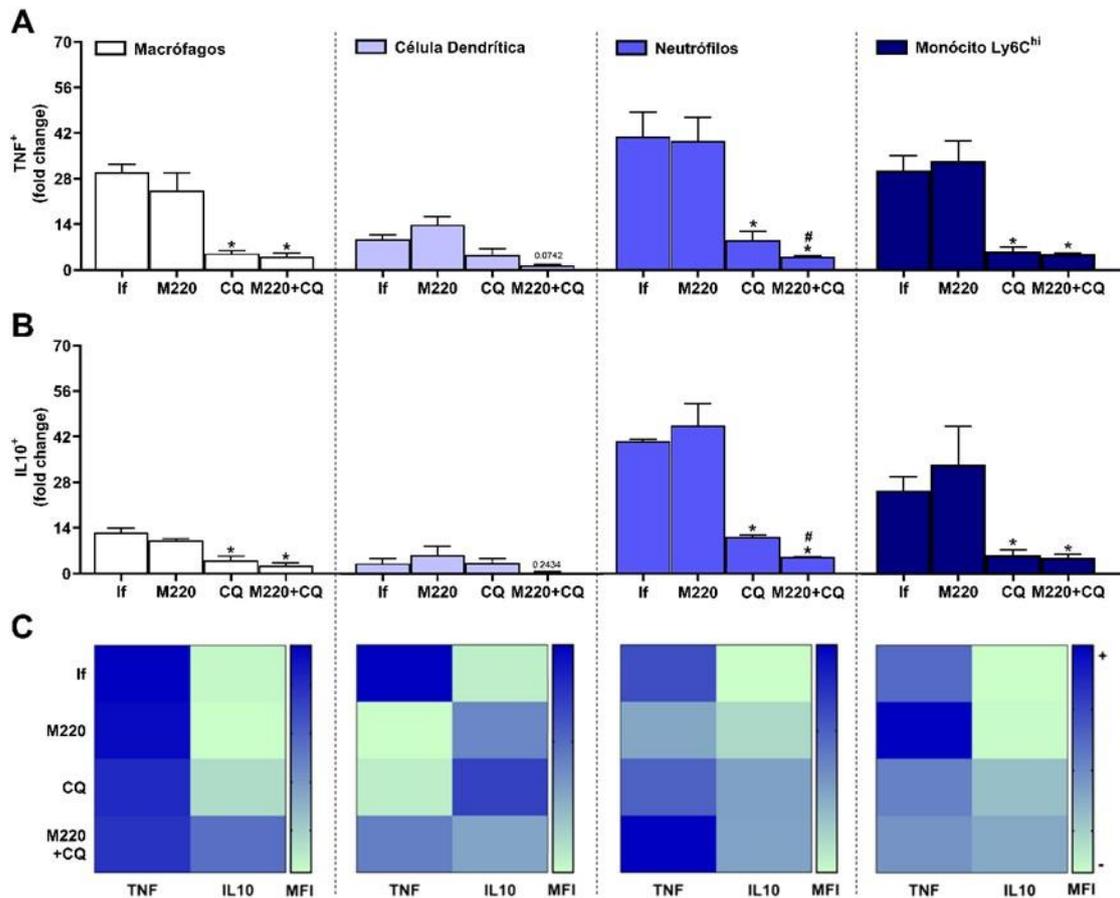
Figura 14. Camundongos infectados e tratados com M220+CQ têm um aumento de células positivas para IL-10 e IL-17A e de linfócitos Treg no pulmão

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na legenda da Figura 1. Os camundongos foram sacrificados no 5º dpi, os pulmões foram colhidos e homogeneizados e as populações de células residentes e sequestradas foram analisadas por citometria de fluxo. **(A)** Linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> positivos para IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17A e Foxp3 (Treg). **(B)** Heat map representando o MFI de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-17A em células T CD4<sup>+</sup>. **(C)** Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram positivos para IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17A e Foxp3 (Treg). **(D)** Heat map representando o MFI de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-17A em células T CD8<sup>+</sup>. Em todos os heat maps, a escala de cores corresponde aos níveis relativos do MFI para cada citocina analisada (dados apresentados em escala de cinza; preto indica níveis mais altos de MFI de citocina e branco indica os níveis mais baixos de MFI de citocina). Os dados apresentados nos gráficos representam valores dos números de células normalizados pelos animais controle não infectados (fold-change). Os dados são representativos de pelo menos dois experimentos independentes (três camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando, usando One-way ANOVA com Tukey's como pós-teste e o teste t de Student. # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. \* ou #  $p < 0,05$ .

#### **4.11. Tratamento com CQ e/ou M220+CQ reduz o número de macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup> positivos para TNF e IL-10 no baço de animais infectados**

O baço contém várias células imunes e estromais, proporcionando um ambiente para rastrear o sangue em busca de moléculas e organismos estranhos e ativar células imunes [42]. Durante a infecção por PbA, as hemácias infectadas circulam pelo organismo sendo o baço, um órgão essencial para a ativação e/ou geração/expansão de células imunes contra esta infecção. Os resultados demonstram que o tratamento com M220+CQ reduziu o número de TNF<sup>+</sup> e IL-10<sup>+</sup> em macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup> (**Figuras 15A e 15B**) se comparados com o grupo infectado não tratado. Importante ressaltar que, o tratamento com M220+CQ afetou a estabilidade da produção de citocinas de TNF e IL-10, reduzindo o TNF e aumentando

os níveis de IL-10 por esses subconjuntos de células, exceto para neutrófilos (**Figura 15C**).



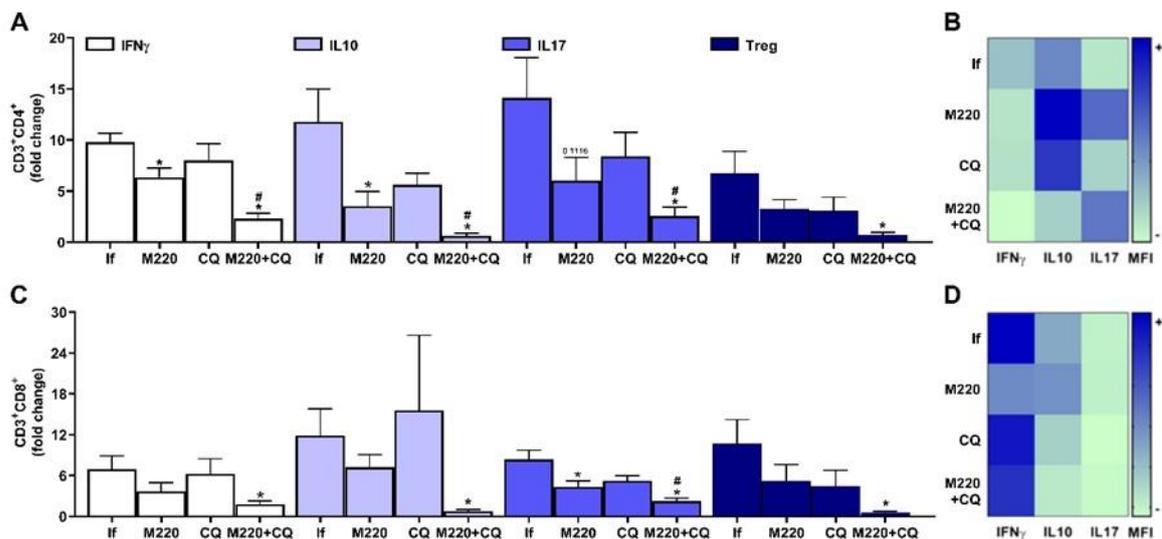
**Figura 15.** Tratamento com CQ e/ou M220+CQ reduz o número de macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup> positivos para TNF e IL-10 no baço de animais infectados

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com PbA e tratados conforme descrito na legenda da Figura 1. Os camundongos foram sacrificados no 5<sup>o</sup> dpi, os baços foram colhidos e homogeneizados e os esplenócitos foram analisados por citometria de fluxo. **(A, B)** Células CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (macrófagos), CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> (DCs), CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (neutrófilos) e Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (monócitos Ly6C<sup>hi</sup>) foram positivos para TNF **(A)** e IL-10 **(B)**. **(C)** Heat map representando a intensidade de fluorescência mediana (MFI) de TNF e IL-10 em macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup>. Em todos os heat maps, a escala de cores corresponde aos níveis relativos de MFI para cada citocina analisada (dados apresentados em escala de cinza; preto indica os níveis mais altos de MFI de citocina e branco indica níveis mais baixos de MFI de citocina). Os dados apresentados nos gráficos representam valores dos números de células normalizados pelos animais controle não infectados (fold-change). Os dados são

representativos de dois experimentos independentes (seis camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando One-way ANOVA com Tukey's como pós-teste e o teste *t* de Student. # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. \* ou #  $p < 0,05$ .

#### 4.12. Tratamento com M220 promove redução drástica de todos os linfócitos assim como suas produções de citocinas no baço

Quando avaliamos as células da imunidade adaptativa, os resultados demonstram que camundongos infectados tratados com M220+CQ sofreram uma redução profunda nos linfócitos Th1, Th2, Th17 e Treg (**Figura 16A**), células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN $\gamma$ , IL-10 ou IL-17A e linfócitos Treg CD8<sup>+</sup> (**Figura 16C**). No baço, o tratamento com M220+CQ, mas não com apenas CQ, reduziu a produção de IFN $\gamma$  e IL-10 pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando comparado com camundongos infectados não tratados (**Figuras 16B e 16D**).



**Figura 16. Tratamento com M220 promove redução drástica de todos os linfócitos assim como suas produções de citocinas no baço**

Camundongos C57Bl/6 foram infectados com *PbA* e tratados conforme descrito na legenda da Figura 1. Os camundongos foram sacrificados no 5<sup>o</sup> dpi, os baços foram colhidos e

homogeneizados e os esplenócitos foram analisados por citometria de fluxo. **(A)** Linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> positivos para IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17A e FOXP3 (Treg). **(B)** Heat map representando o MFI de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-17A em células T CD4<sup>+</sup>. **(C)** Os linfócitos CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> foram positivos para IFN $\gamma$ , IL-10, IL-17A e FOXP3 (Treg). **(D)** Heat map representando o MFI de IFN $\gamma$ , IL-10 e IL-17A em células T CD8<sup>+</sup>. Em todos os heat maps, a escala de cores corresponde aos níveis relativos de MFI para cada citocina analisada (dados apresentados em escala de cinza; preto indica os níveis mais altos de MFI de citocina e branco indica níveis mais baixos de MFI de citocina). Os dados apresentados nos gráficos representam valores dos números de células normalizados pelos animais controle não infectados (fold-change). Os dados são representativos de dois experimentos independentes (seis camundongos/grupo) sendo apresentados como a média  $\pm$  SEM. A análise estatística foi realizada usando One-way ANOVA com Tukey's como pós-teste e o teste t de Student. # para comparação do grupo CQ vs. grupo M220+CQ; \* para comparação de grupos infectados tratados vs. grupo infectado não tratado. \* ou #  $p < 0,05$ .

## 5. DISCUSSÃO

A malária grave tem uma alta taxa de mortalidade. Esta doença produz inflamação intensa, causando várias complicações de saúde (138). Além da morte, o principal desafio para a infecção da malária são os efeitos colaterais dos medicamentos antimaláricos, que podem causar a persistência dos sintomas ou até piorar os sintomas após o tratamento (128,139). Os resultados aqui apresentados mostraram que os altos índices de carga parasitária não são os responsáveis diretos pela causa da morte de camundongos em modelo experimental da doença. O tratamento aqui proposto com o composto M220, com estrutura química base de amido-cumarina, prolongou o tempo de sobrevivência dos animais tratados (cerca de 4x mais), se comparado a animais apenas infectados. A seleção do composto M220 para o seu estudo nos modelos de malária teve como base uma triagem *in vitro* prévia, onde foram testados diferentes compostos fenólicos com diversidade química estrutural. Todos esses compostos são de origem sintética e foram estudados porque previamente provaram ter um elevado interesse como antioxidantes e neuroprotectores.

O tratamento com M220 associado a CQ aumentou em mais de 6x o tempo de sobrevivência em comparação a animais apenas infectados. O tratamento também possibilitou a sobrevivência de cerca de 60% dos animais, superando os resultados encontrados em animais tratados apenas com a CQ. Possivelmente o M220 desempenhou função protetora não especificamente atuando na carga parasitária como é relatado pela literatura (140), mas sim reduzindo os danos da infecção que promovem a morte de animais infectados por *Plasmodium*.

Sinais clínicos de fraqueza, dor e exaustão aparente foram descritos na malária humana (141–143). A infecção por PbA proporciona alguns destes sinais clínicos mimetiza a clínica (93,144). É importante ressaltar que o tratamento com o composto M220 melhorou significativamente o desconfortos e sinais clínicos visualmente mensuráveis (RMCB score) quando comparados aos animais apenas infectados, indicando que o tratamento se mostra promissor em atenuar os sofrimentos que a infecção causa. O ganho e a perda de peso são importantes na malária, pois caminham juntamente com o desenvolvimento da doença. A malária humana também causa náuseas e perdas de apetite, o que frequentemente dificulta a alimentação adequada desses pacientes, levando à perda de peso (143,145). Os animais infectados perdem peso próximo do momento de morte. Quando tratados, os animais apresentam perda de peso ainda que menor se comparadas aos animais apenas infectados. Quando comparados os tratamentos é possível observar que, animais infectados e tratados com M220+CQ em nenhum dos pontos avaliados indicaram perda de peso significativa. Isto permite inferir que esses animais mantiveram seu apetite e alimentação em níveis normais. Mais uma vez, o M220 está evitando algumas das desvantagens do uso do CQ.

A malária grave, como dito anteriormente, é uma doença que pode ser fatal se não for tratada rapidamente (4) e, mesmo sob tratamento efetivo, pode causar sérios danos as pessoas acometidas (92,95). O modelo de malária grave utilizado neste trabalho pode levar ao desenvolvimento da malária cerebral em camundongos. Isso permite investigar melhores formas de sanar os possíveis efeitos indesejados que as terapias atuais podem causar, a exemplo da perda de capacidade cognitiva (146,147). Sabemos que o tratamento com antimaláricos, como a CQ, exerce seu papel de controle do parasito, porém com certos efeitos colaterais (92), não evitando

completamente as sequelas que acometem o SNC (92,148). Os dados aqui apresentados corroboram com a literatura [17,45], demonstrando que o processo de infecção por PbA causa a perda de capacidade de formação de memória. Esta capacidade foi perdida em camundongos tratados com CQ (**Figure 1E**). Com base nos resultados dos testes de reconhecimento de objeto novo, o tratamento com o composto M220 preservou a capacidade dos animais de formar memória, com resultados semelhantes aos animais não infectados, assim como quando tratados com M220+CQ. Pode-se dizer também que esta neuroproteção é duradoura, visto que o tratamento foi interrompido após 12 dpi, os animais mantiveram sua capacidade de formar memória nos resultados obtidos do teste refeito após 47 dpi, onde foi possível comparar os animais tratados com M220+CQ com os animais controles. Estudos mostram que em modelos de doenças neurodegenerativas em animais, o tratamento com cumarinas melhora a função cognitiva, incluindo memória e aprendizado (149,150). Estudos animais e em cultura de células sugerem que algumas cumarinas, como a escopoletina e a umbeliferona, apresentaram propriedades neuroprotetoras em doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e Parkinson (150,151).

Tendo em vista que o tratamento como composto M220 teve duração de 10 dias, estes resultados sugerem que o composto atuou na capacidade de formar memória dos animais de maneira eficiente e, com efeito prolongado, indicando forte potencial neuroprotetor. Algumas construções cumarínicas já foram descritas propriedades antioxidantes que podem apresentar propriedades protetoras no cérebro, contra o estresse oxidativo (152,153), que durante a infecção por malária podem provocar danos ao tecido cerebral (87,154). Ou mesmo propriedades anti-inflamatórias (153), que podem ajudar a reduzir a inflamação no cérebro, justificando assim alguns dos achados aqui apresentados.

Para melhor elucidar os achados supracitados, a resposta imunológica pode nos ajudar a responder de que maneira o composto age nos animais infectados com PbA. É bem sabido que o equilíbrio da resposta pró e anti-inflamatória orchestra o desfecho da infecção (155). Células microgliais residem no parênquima do SNC e compartilham diversas propriedades dos macrófagos (50). Após o dano neuronal ou tecidual, as células micróglia mudam sua forma e fenótipo imunocitoquímico para um estado 'ativado' (156–158). A função microglial é importante contra agentes infecciosos, atuando na resposta imune inicial e no recrutamento de células periféricas do sistema imune como neutrófilos, monócitos e linfócitos T para o local da infecção (50,159). Os resultados deste trabalho, por análise de citometria de fluxo, mostram que há aumento do número de células marcadas como residentes (micróglia) e células migratórias no tecido cerebral infectado. Os animais infectados e tratados com CQ, e ainda melhor quando tratados com o composto M220+CQ, mostram redução do número de micróglia e células migratórias, alcançando níveis semelhantes aos animais sem infecção. As células que migraram para este tecido também se encontravam reduzidas no tratamento, comparados aos animais infectados, indicando que possivelmente não foram necessários recrutamentos celulares para a região cerebral.

Uma resposta pro-inflamatória é importante para a proteção contra patógenos como o da malária. Citocinas como TNF e IFN $\gamma$  possuem um papel antiparasitário (160). Os resultados do presente trabalho demonstram que durante a infecção por PbA, diversos subtipos celulares positivos para TNF estão com seus números aumentados. Entretanto, a literatura nos mostra uma associação entre malária grave e quantidades aumentadas de respostas de citocinas, que incluem TNF, IL1 $\beta$ , IL-6, IL-10 e IFN $\gamma$  (161–163). Os animais submetidos a tratamento do composto M220+CQ

apresentaram significativas reduções nas populações de macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup> positivos para TNF no cérebro durante a infecção por PbA se comparados aos grupos infectados não tratados. Um subtipo celular extremamente importante para a patogênese da malária são as monócitos/macrófagos células Ly6C<sup>hi</sup> que estão associadas a gravidade da malária cerebral (164). A redução do perfil de monócitos/macrófagos Ly6C<sup>hi</sup> é benéfica para os camundongos uma vez que sintomas neurológicos durante a malária cerebral experimental estão associados à migração de monócitos/macrófagos Ly6C<sup>hi</sup> e células TCD8 (164), além disso, o acúmulo de monócitos/macrófagos Ly6C<sup>hi</sup> no cérebro pode ser letal (164–166). Os resultados deste trabalho demonstraram que quando comparados ao grupo infectado, monócitos/macrófagos Ly6C<sup>hi</sup> positivos para TNF se encontram com o número de células reduzida assim como a produção dessa citocina no cérebro de animais tratados com o composto juntamente com a CQ, sugerindo outro possível ponto benéfico de atuação do composto no cérebro.

Além de TNF, as citocinas IFN $\gamma$  e IL-17A também estão associadas a um risco maior de desenvolver malária cerebral (167). Embora IFN $\gamma$  possa induzir respostas imunes protetoras contra parasitemia, reinfecções e anemia (168), sua redução ou ausência diminui significativamente a patogênese da malária (76,169). O tratamento com M220+CQ reduziu o número de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> positivas para IFN $\gamma$  e IL-17A e diminuiu a produção dessas citocinas. Como a citocina IFN $\gamma$  está associada também ao desempenho de tarefas cognitivas associadas ao hipocampo e a ausência de IFN $\gamma$  leva a um melhor desempenho em tarefas cognitivas que envolvem o hipocampo (170), um mecanismo pelo qual o tratamento com M220 protege a memória, modulando a produção de citocinas importantes envolvidas na patogênese da malária.

Outro achado importante que pode estar associado à proteção descrita foi o aumento do número de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> positivos para IL-10. É bem conhecido que a IL-10 desempenha um papel regulador no desenvolvimento de patogêneses associadas à malária grave, induzindo um ambiente anti-inflamatório (86). É importante ressaltar que o tratamento com M220+CQ também aumentou os níveis de produção de IL-10 por macrófagos, neutrófilos e micróglia no cérebro durante a infecção por PbA. Assim, o tratamento com M220+CQ diminuiu o número de células residentes e recrutadas das respostas imunes inata e adaptativa, produzindo citocinas pró-inflamatórias e promovendo um ambiente menos inflamatório no cérebro, justificando mais uma vez os resultados de melhor prognóstico da infecção por PbA após o tratamento com M220. Sendo assim, demonstra-se uma redução do número de células residentes e recrutadas, bem como das citocinas pró-inflamatórias. Portanto, estes dados sugerem que o tratamento com M220+CQ promove um ambiente menos inflamado no cérebro dos animais quando comparado ao grupo apenas infectado.

Por se tratar de um modelo que afeta o cérebro, é natural dar menos ênfase a outros pontos de acometimento da doença, porém é importante ressaltar que a infecção por PbA é primeiramente um modelo de malária grave. A malária grave contempla outras investigações, como o acometimento dos pulmões [3,56], com a síndrome da angústia respiratória aguda associada à malária (SDRA-AM), a qual é uma complicação causada pela doença, apesar do tratamento com antimalárico (18,76).

Não há estudos que investiguem especificamente a relação entre cumarinas e sintomas respiratórios, tampouco relacionados à SDRA-AM. No entanto, existem algumas evidências de que as cumarinas podem ter propriedades anti-inflamatórias,

como já mencionado, e imunomoduladoras, que podem ser relevantes para a prevenção ou tratamento de sintomas respiratórios associados à malária.

Ghosh e colaboradores relataram que a cumarina umbeliferona, encontrada em várias plantas medicinais, incluindo algumas usadas tradicionalmente para tratar a malária, pode ter efeitos anti-inflamatórios e imunomoduladores (172). O estudo mostrou que a umbeliferona foi capaz de reduzir a produção de citocinas inflamatórias em células imunes humanas (172), o que pode, de certa maneira, elucidar os achados encontrados nos animais tratados com M220.

Além disso, Plirat e colaboradores publicaram recentemente (2022) o potencial de uma combinação de cumarinas derivadas de plantas medicinais tradicionais para melhorar a resposta imunológica do hospedeiro à malária (173). O estudo mostrou que fitoterápico que contia diversas ervas, incluindo cumarinas e de atividade antialérgica, anti-inflamatória e antioxidante, foi capaz de melhorar a resposta imunológica em camundongos infectados com malária, incluindo a produção de anticorpos e a atividade das células imunes, o que pode ser relevante para prevenir ou tratar complicações respiratórias associadas à malária.

Dessa forma, avaliamos a capacidade respiratória dos animais infectados por PbA e tratados com o composto M220. Os resultados aqui apresentados corroboram com a literatura, onde os animais infectados com PbA encontram-se com sua capacidade pulmonar prejudicada (55,56). Aos 6 dias após infecção, apenas o tratamento com o composto M220+CQ manteve a capacidade pulmonar preservada, o que não se observa nos demais tratamentos e nos animais apenas infectados. Estes achados demonstram um bônus de ação do composto M220. Aqui, evidenciamos um

potencial de atuação também na capacidade pulmonar de animais infectados com PbA.

No presente estudo, camundongos não tratados infectados com PbA apresentaram capacidade pulmonar prejudicada. O tratamento com M220+CQ demonstrou melhores efeitos na manutenção da função pulmonar do que os outros grupos. Esses achados demonstram um efeito adicional do composto M220, que trata a malária grave, protege tanto a capacidade e função pulmonar quanto a atividade cognitiva e do sistema nervoso central. A proteção pulmonar pode estar relacionada a um número aumentado de células positivas para IL-10 residentes (macrófagos alveolares) e migradas (macrófagos, células dendríticas e neutrófilos), bem como níveis aumentados de produção de IL-10 por essas células.

Macrófagos alveolares são a fonte mais importante de IL-10 em pulmões saudáveis, secretada constitutivamente em condições normais (174). Estudos em camundongos identificaram um papel anti-inflamatório de IL-10 e como um preventivo de possíveis danos aos tecidos que uma inflamação pode causar no órgão (175–177). Portanto, o aumento da produção de IL-10 pode ser uma explicação de porque os pulmões de camundongos tratados com M220 exibem características de pulmões não fibróticos. Além disso, foi observada uma redução significativa de IFN $\gamma$  nos pulmões, o que, conforme discutido para o cérebro, indica um cenário favorável para melhorar a proteção contra o desenvolvimento da patogênese da doença. Outro benefício importante do M220 foi o aumento do número de Tregs, tanto CD4<sup>+</sup> quanto CD8<sup>+</sup>, apesar do aumento de Th17. O aumento de células Th2 e Tregs pode contrabalançar a presença de Th17, protegendo, assim, contra lesões pulmonares. Notavelmente, a IL-17A pode ser prejudicial à saúde pulmonar em casos de lesão pulmonar aguda (178,179), embora esta citocina proteja contra vários patógenos. Além disso, podemos

encontrar grandes benefícios da IL-17A como uma citocina protetora contra uma variedade de patógenos. Por exemplo, foi demonstrado que camundongos deficientes em IL-17A são mais suscetíveis a uma variedade de patógenos respiratórios, incluindo fungos (180) e bactérias (181). Com base em nossos resultados, podemos inferir que, durante a infecção por malária, as células Th17 não mostram suas características prejudiciais durante o tratamento. Mais pesquisas são necessárias para entender como isso ajuda positivamente a proteger os camundongos tratados.

Como foram observadas melhoras nas funções pulmonares e nos perfis de células imunes, a histologia apresentada mostra um melhor prognóstico da doença, onde os animais tratados com M220+CQ têm melhores avaliações no escore semiquantitativo se comparados aos animais apenas infectados e aos infectados tratados apenas com CQ. Sendo assim, o composto cumpriu a função proposta em sua construção química de neuroprotetor, estendendo-se a outros acometimentos da própria infecção por malária, como a síndrome do desconforto respiratório melhorando as funções pulmonares e preservando o tecido pulmonar.

O baço é um órgão crucial para a eliminação de glóbulos vermelhos parasitados e a geração de imunidade durante a malária (182). É também o local primário onde a resposta imune adaptativa contra o estágio sanguíneo da infecção por *Plasmodium* é iniciada (44). Sendo um órgão linfóide secundário que recebe diretamente o sangue circulante e, por consequência, influência direta de hemácias infectadas, investigar o baço durante a infecção por *Plasmodium* é extremamente importante. Como mostrado nos resultados deste trabalho, ao receber os tratamentos com CQ ou M220+CQ, observamos reduções significativas das células da imunidade inata neste órgão. É possível inferir que, como a CQ combate o parasito de forma eficiente em seu estágio sanguíneo (183,184), pode contribuir para a redução da geração e diferenciação de

macrófagos, DCs, neutrófilos e monócitos Ly6C<sup>hi</sup> assim como sua migração para o baço. No entanto, o tratamento com M220+CQ, reduziu o número de todos os subconjuntos de linfócitos avaliados, em comparação com camundongos infectados não tratados. Notavelmente, as células reduzidas que ainda migraram e/ou foram geradas no baço sustentaram um ambiente anti-inflamatório, produzindo níveis mais baixos de TNF e níveis mais altos de IL-10 (macrófagos, DCs e monócitos Ly6C<sup>hi</sup>) e níveis mais baixos de IFN $\gamma$  linfócitos (CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>), comparando com camundongos infectados não tratados.

A modulação/controle da produção de quimiocinas durante o tratamento com M220+CQ também pode ter contribuído para a proteção do SNC e dos pulmões, reduzindo a migração e/ou expansão da inflamação. No entanto, análises futuras são necessárias para confirmar ou investigar essa hipótese, principalmente avaliando os níveis de produção de CCL2, CCL4, CXCL4, CXCL8, CXCL10 e os receptores CXCR3 e CCR2, correlacionados com a suscetibilidade à malária cerebral e à inflamação pulmonar (38,46,83).

Neste trabalho, foram apresentados resultados que levam a inferir um comportamento imunomodulador do hospedeiro, incluindo a redução da inflamação e o aumento da produção de citocinas protetoras pelo composto M220. No entanto, é importante ressaltar que os mecanismos de ação específicos das cumarinas podem variar dependendo do composto e do estágio do parasita em que são aplicadas. Para todos os achados a respeito das cumarinas, são estruturas diferentes umas das outras, e isso mostra que uma forma específica de cumarina não é responsável por todas as possíveis funções e ações dessa estrutura. As modificações em cumarinas, ou a falta delas, podem determinar sua maior ou menor eficiência nos estudos que as utilizam, incluindo os explorados aqui.

Estudos têm demonstrado que modificações na estrutura química das cumarinas podem afetar significativamente sua atividade antimalárica e toxicidade. Um exemplo comum de modificação na estrutura das cumarinas é a substituição de grupos funcionais em sua estrutura. A presença de grupos hidroxila na estrutura das cumarinas tem sido associada à atividade antioxidante e anti-inflamatória (185,186), o que pode ajudar a reduzir a inflamação associada à infecção por malária. Portanto, a construção das cumarinas é um fator importante na determinação de sua atividade durante a infecção por malária, e pode ser modificada para melhorar sua eficácia e reduzir sua toxicidade. A cumarina utilizada neste estudo (M220) apresentou comportamentos desejados em relação aos processos de infecção por malária grave em modelo experimental. No entanto, são necessários mais estudos para avaliar a eficácia e a segurança dessas modificações na estrutura das cumarinas, bem como sua capacidade de combater a resistência do parasita aos medicamentos antimaláricos existentes.

Isto posto, podemos inferir que, com exceção das células residentes dos órgãos cérebro e pulmão, as reduções observadas nos órgãos citados podem ser devidas à não expansão e/ou migração das células imunes. Conforme evidenciado pelos resultados deste trabalho, o tratamento conjunto de M220+CQ pode, de alguma maneira ainda não bem compreendida, modular a imunidade, tendo um efeito benéfico durante a infecção por PbA.

## 6. CONCLUSÃO

No geral, o presente estudo sugere que o composto M220, principalmente combinado com CQ, exerce efeitos imunomoduladores, neuroprotetores e preservadores da função pulmonar, tornando-o um forte candidato terapêutico para a malária grave.

Da série estudada, o M220 se mostrou o composto mais promissor. Aqui, demonstramos que o tratamento com M220 reduziu as lesões cerebrais e pulmonares, atenuando a inflamação e os danos nos tecidos e protegendo os camundongos da mortalidade durante o modelo experimental de malária grave em camundongos. A administração de M220 reduz o acúmulo de micróglia e leucócitos e a produção de citocinas inflamatórias (TNF/IFN $\gamma$ ), e aumenta a citocina IL-10 anti-inflamatória e protetora de tecidos, secretada principalmente por células imunes inatas e adaptativas. No geral, a administração de M220 promove efeitos imunomoduladores, neuroprotetores e de preservação da função pulmonar. O tratamento revelou-se eficaz em ambos os órgãos afetados principalmente pela malária grave: cérebro e pulmões. Além disso, o M220 mostrou-se ideal para administração oral no modelo de camundongos, tornando-se uma opção terapêutica muito interessante para o tratamento desta doença grave.

## 7. PERSPECTIVAS

Como continuidades deste trabalho, existem diversas questões relevantes que poderiam ser abordadas para enriquecer e esclarecer os pontos que elucidam melhor o papel das cumarinas no tratamento da malária e suas complicações.

Uma delas é a identificação de outra concentração ou dose de M220 que exerça a função neuroprotetora e também apresente atividade antimalárica. Isso leva à necessidade de aprofundamento no tratamento da malária e suas complicações. A dose utilizada no presente estudo foi de 10 mg/kg, e o co-tratamento apresentou resultados relevantes no tratamento da malária grave. Por se tratar de uma experimentação nova e sem muitos precedentes do uso do composto M220, a dose utilizada teve como referência tratamentos contra doenças que provocam danos cerebrais, como doenças neurodegenerativas. No entanto, considerando os relatos de cumarinas com atividades antimaláricas na literatura, vale investigar se doses mais altas ou mais baixas poderiam manter a neuroproteção aqui apresentada, bem como a atividade antimalárica encontrada por outras cumarinas.

Outros pontos importantes precisam ser elucidados, como outras combinações com antimaláricos e o M220, como a artemisinina, outro antimalárico bastante utilizado. Além disso, é necessário investigar os mecanismos de ação das cumarinas na malária, incluindo a interação com proteínas envolvidas no ciclo de vida do parasita; estudar a atividade das cumarinas em diferentes espécies de *Plasmodium*; e avaliar o potencial das cumarinas para combater a resistência aos medicamentos antimaláricos.

Essas são possíveis direções de pesquisa futuras e continuação que poderiam ser exploradas para avançar nos estudos das cumarinas no tratamento da malária.

## 8. REFERÊNCIAS

1. Phillips MA, Burrows JN, Manyando C, van Huijsduijnen RH, Van Voorhis WC, Wells TNC. Malaria. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Aug 3;3(1):17050.
2. Brasil P, Zalis MG, de Pina-Costa A, Siqueira AM, Júnior CB, Silva S, et al. Outbreak of human malaria caused by *Plasmodium simium* in the Atlantic Forest in Rio de Janeiro: a molecular epidemiological investigation. *The Lancet Global Health*. 2017 Oct;5(10):e1038–46.
3. Basu S, Sahi PK. Malaria: An Update. *Indian J Pediatr*. 2017 Jul;84(7):521–8.
4. WHO. World malaria report, Geneva: World Health Organization; 2022. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. 2022;
5. World Health Organization. WHO Guidelines for malaria, 14 March 2023. 2023.
6. Global technical strategy for malaria 2016–2030, 2021 update. 2021;
7. World Health Organization. A framework for malaria elimination [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2017 [cited 2023 Mar 15]. 92 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254761>
8. Secretaria de Vigilância em Saúde M da S. Boletim Epidemiológico Vol.53 N°17. 2022.
9. Giovanni Battista. Studi di uno zoologo sulla malaria. 1901.
10. Cunha CB, Cunha BA. Brief history of the clinical diagnosis of malaria: from Hippocrates to Osler. *J VECTOR BORNE DIS*. 2008;
11. Cunha BA. Osler on typhoid fever: differentiating typhoid from typhus and malaria. *Infectious Disease Clinics of North America*. 2004 Mar;18(1):111–25.
12. Schofield L, Grau GE. Immunological processes in malaria pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. 2005 Sep 1;5(9):722–35.
13. Aly ASI, Vaughan AM, Kappe SHI. Malaria Parasite Development in the Mosquito and Infection of the Mammalian Host. *Annu Rev Microbiol*. 2009 Oct 1;63(1):195–221.
14. Fernandes P, Loubens M, Marinach C, Coppée R, Baron L, Grand M, et al. *Plasmodium* sporozoites require the protein B9 to invade hepatocytes. *iScience*. 2023 Feb;26(2):106056.
15. Bucşan AN, Williamson KC. Setting the stage: The initial immune response to blood-stage parasites. *Virulence*. 2020 Dec 31;11(1):88–103.
16. Cowman AF, Healer J, Marapana D, Marsh K. Malaria: Biology and Disease. *Cell*. 2016 Oct;167(3):610–24.

17. Henry B, Roussel C, Carucci M, Brousse V, Ndour PA, Buffet P. The Human Spleen in Malaria: Filter or Shelter? *Trends in Parasitology*. 2020 May;36(5):435–46.
18. Vandermosten L, Pham TT, Possemiers H, Knoops S, Van Herck E, Deckers J, et al. Experimental malaria-associated acute respiratory distress syndrome is dependent on the parasite-host combination and coincides with normocyte invasion. *Malar J*. 2018 Dec;17(1):102.
19. Trampuz A, Jereb M, Muzlovic I, Prabhu RM. [No title found]. *Crit Care*. 2003;7(4):315.
20. Wassmer SC, Grau GER. Severe malaria: what's new on the pathogenesis front? *International Journal for Parasitology*. 2017 Feb;47(2–3):145–52.
21. Song X, Wei W, Cheng W, Zhu H, Wang W, Dong H, et al. Cerebral malaria induced by *Plasmodium falciparum*: clinical features, pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Jul 25;12:939532.
22. Moxon CA, Gibbins MP, McGuinness D, Milner DA, Marti M. New Insights into Malaria Pathogenesis. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*. 2020;15(1):315–43.
23. Clark IA, Alleva LM. Is human malarial coma caused, or merely deepened, by sequestration? *Trends in Parasitology*. 2009 Jul;25(7):314–8.
24. Medana IM, Chaudhri G, Chan-Ling T, Hunt NH. Central nervous system in cerebral malaria: 'Innocent bystander' or active participant in the induction of immunopathology? *Immunol Cell Biol*. 2001 Apr;79(2):101–20.
25. Medana IM, Hunt NH, Chaudhri G. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Expression in the Brain during Fatal Murine Cerebral Malaria. 1997;150(4).
26. Jensen AR, Adams Y, Hviid L. Cerebral *Plasmodium falciparum* malaria: The role of PfEMP1 in its pathogenesis and immunity, and PfEMP1-based vaccines to prevent it. *Immunol Rev*. 2020 Jan;293(1):230–52.
27. Fried M, Duffy PE. Adherence of *Plasmodium falciparum* to Chondroitin Sulfate A in the Human Placenta. *Science*. 1996 Jun 7;272(5267):1502–4.
28. Ponsford MJ, Medana IM, Prapansilp P, Hien TT, Lee SJ, Dondorp AM, et al. Sequestration and Microvascular Congestion Are Associated With Coma in Human Cerebral Malaria. *Journal of Infectious Diseases*. 2012 Feb 15;205(4):663–71.
29. Storm J, Jespersen JS, Seydel KB, Szeszak T, Mbewe M, Chisala NV, et al. Cerebral malaria is associated with differential cytoadherence to brain endothelial cells. *EMBO Mol Med* [Internet]. 2019 Feb [cited 2023 Mar 16];11(2). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.15252/emmm.201809164>
30. Oluwayemi IO, Brown BJ, Oyedeji OA, Oluwayemi MA. Neurological sequelae in survivors of cerebral malaria. *Pan Afr Med J* [Internet]. 2013 [cited 2023 Mar

- 16];15. Available from: <http://www.panafrican-med-journal.com/content/article/15/88/full/>
31. Hawkes M, Elphinstone RE, Conroy AL, Kain KC. Contrasting pediatric and adult cerebral malaria: The role of the endothelial barrier. *Virulence*. 2013 Aug 15;4(6):543–55.
  32. Trivedi S, Chakravarty A. Neurological Complications of Malaria. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2022 Aug;22(8):499–513.
  33. Deroost K, Pham TT, Opdenakker G, Van den Steen PE. The immunological balance between host and parasite in malaria. van Ooij C, editor. *FEMS Microbiology Reviews*. 2016 Mar;40(2):208–57.
  34. Walther M, Woodruff J, Edele F, Jeffries D, Tongren JE, King E, et al. Innate Immune Responses to Human Malaria: Heterogeneous Cytokine Responses to Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Correlate with Parasitological and Clinical Outcomes. *The Journal of Immunology*. 2006 Oct 15;177(8):5736–45.
  35. Gazzinelli RT, Kalantari P, Fitzgerald KA, Golenbock DT. Innate sensing of malaria parasites. *Nat Rev Immunol*. 2014 Nov;14(11):744–57.
  36. Gowda DC, Wu X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front Immunol*. 2018 Dec 19;9:3006.
  37. Derian CK, Solomon HF, Higgins JD, Beblavy MJ, Santulli RJ, Bridger GJ, et al. Selective Inhibition of *N*-Formylpeptide-Induced Neutrophil Activation by Carbamate-Modified Peptide Analogues. *Biochemistry*. 1996 Jan 1;35(4):1265–9.
  38. Van den Steen PE, Deroost K, Aelst IV, Geurts N, Martens E, Struyf S, et al. CXCR3 determines strain susceptibility to murine cerebral malaria by mediating T lymphocyte migration toward IFN- $\gamma$ -induced chemokines. *Eur J Immunol*. 2008 Apr;38(4):1082–95.
  39. Amorim KNS, Chagas DCG, Sulczewski FB, Boscardin SB. Dendritic Cells and Their Multiple Roles during Malaria Infection. *Journal of Immunology Research*. 2016;2016:1–11.
  40. Götz A, Tang MS, Ty MC, Arama C, Ongoiba A, Doumtable D, et al. Atypical activation of dendritic cells by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2017 Dec 5 [cited 2023 Mar 13];114(49). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1708383114>
  41. Kurup SP, Butler NS, Harty JT. T cell-mediated immunity to malaria. *Nat Rev Immunol*. 2019 Jul;19(7):457–71.
  42. Krummel MF, Bartumeus F, Gérard A. T cell migration, search strategies and mechanisms. *Nat Rev Immunol*. 2016 Mar;16(3):193–201.
  43. Riggle BA, Manglani M, Maric D, Johnson KR, Lee MH, Neto OLA, et al. CD8+ T cells target cerebrovasculature in children with cerebral malaria. *Journal of Clinical Investigation*. 2020 Feb 17;130(3):1128–38.

44. Bronte V, Pittet MJ. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity*. 2013 Nov;39(5):806–18.
45. Ghosh D, Stumhofer JS. The spleen: “epicenter” in malaria infection and immunity. *Journal of Leukocyte Biology*. 2021 Sep 29;110(4):753–69.
46. Dunst J, Kamena F, Matuschewski K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017 Jul 20;7:324.
47. Walsh KP, Mills KHG. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends in Immunology*. 2013 Nov;34(11):521–30.
48. Götz A, Tang MS, Ty MC, Arama C, Ongoiba A, Doumtable D, et al. Atypical activation of dendritic cells by *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci USA* [Internet]. 2017 Dec 5 [cited 2023 Feb 8];114(49). Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1708383114>
49. Autino B, Corbett Y, Castelli F, Taramelli D. PATHOGENESIS OF MALARIA IN TISSUES AND BLOOD. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012 Oct 4;4(1):e2012061.
50. Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, Lokensgard JR, et al. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clin Microbiol Rev*. 2004 Oct;17(4):942–64.
51. Howland SW, Claser C, Poh CM, Gun SY, Rénia L. Pathogenic CD8+ T cells in experimental cerebral malaria. *Semin Immunopathol*. 2015 May;37(3):221–31.
52. Shikani HJ, Freeman BD, Lisanti MP, Weiss LM, Tanowitz HB, Desruisseaux MS. Cerebral Malaria - We Have Come a Long Way. *The American Journal of Pathology*. 2012 Nov;181(5):1484–92.
53. Haque A, Best SE, Unosson K, Amante FH, de Labastida F, Anstey NM, et al. Granzyme B Expression by CD8+ T Cells Is Required for the Development of Experimental Cerebral Malaria. *The Journal of Immunology*. 2011 Jun 1;186(11):6148–56.
54. Belnoue E, Kayibanda M, Vigario AM, Deschemin JC, Rooijen N van, Viguier M, et al. On the Pathogenic Role of Brain-Sequestered  $\alpha\beta$  CD8+ T Cells in Experimental Cerebral Malaria. *The Journal of Immunology*. 2002 Dec 1;169(11):6369–75.
55. Nguee SYT, Júnior JWBD, Epiphany S, Rénia L, Claser C. Experimental Models to Study the Pathogenesis of Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 May 23;12:899581.
56. Val F, Machado K, Barbosa L, Salinas JL, Siqueira AM, Costa Alecrim MG, et al. Respiratory Complications of *Plasmodium vivax* Malaria: Systematic Review and Meta-Analysis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2017 Sep 7;97(3):733–43.
57. Taylor WRJ, Hanson J, Turner GDH, White NJ, Dondorp AM. Respiratory Manifestations of Malaria. *Chest*. 2012 Aug;142(2):492–505.

58. Baldeviano GC, Lescano AG, Pozo E, Graf PCF, Durand S, Quispe AM, et al. *Plasmodium vivax* Hospitalizations in a Monoendemic Malaria Region: Severe Vivax Malaria? *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2014 Jul 2;91(1):11–7.
59. Van den Steen PE, Deroost K, Deckers J, Van Herck E, Struyf S, Opdenakker G. Pathogenesis of malaria-associated acute respiratory distress syndrome. *Trends in Parasitology*. 2013 Jul;29(7):346–58.
60. Mohan A, Sharma SK, Bollineni S. Acute lung injury and acute respiratory distress syndrome in malaria. *Journal of Vector Borne Diseases*. 2008;179–93.
61. Hwang J, Cullen KA, Kachur SP, Arguin PM, Baird JK. Severe Morbidity and Mortality Risk From Malaria in the United States, 1985–2011. *Open Forum Infectious Diseases*. 2014 Mar 1;1(1):ofu034.
62. Haydoura S, Mazboudi O, Charafeddine K, Bouakl I, Baban TA, Taher AT, et al. Transfusion-related *Plasmodium ovale* malaria complicated by acute respiratory distress syndrome (ARDS) in a non-endemic country. *Parasitology International*. 2011 Jan;60(1):114–6.
63. Seilmaier M, Hartmann W, Beissner M, Fenzl T, Haller C, Guggemos W, et al. Severe *Plasmodium knowlesi* infection with multi-organ failure imported to Germany from Thailand/Myanmar. *Malar J*. 2014 Dec;13(1):422.
64. Mohapatra BN, Jangid SK, Mohanty R. GCRBS Score: A New Scoring System for Predicting Outcome in Severe *Falciparum* Malaria. *Journal of the association of physicians of india*. 2014;62.
65. Londhe C, Ganeriwal A. Study of clinical profile of acute respiratory distress syndrome and acute lung injury in *Plasmodium vivax* malaria. *J Vector Borne Dis*. 2014;
66. Elzein F, Mohammed N, Ali N, Bahloul A, Albadani A, Alsherbeeni N. Pulmonary manifestation of *Plasmodium falciparum* malaria: Case reports and review of the literature. *Respiratory Medicine Case Reports*. 2017;22:83–6.
67. Maguire GP, Handojo T, Pain MCF, Kenangalem E, Price RN, Tjitra E, et al. Lung Injury in Uncomplicated and Severe *Falciparum* Malaria: A Longitudinal Study in Papua, Indonesia. *J INFECT DIS*. 2005 Dec;192(11):1966–74.
68. Cox-Singh J, Singh B, Daneshvar C, Planche T, Parker-Williams J, Krishna S. Anti-Inflammatory Cytokines Predominate in Acute Human *Plasmodium knowlesi* Infections. Hviid L, editor. *PLoS ONE*. 2011 Jun 8;6(6):e20541.
69. Mandala WL, Msefula CL, Gondwe EN, Drayson MT, Molyneux ME, MacLennan CA. Cytokine Profiles in Malawian Children Presenting with Uncomplicated Malaria, Severe Malarial Anemia, and Cerebral Malaria. Pascual DW, editor. *Clin Vaccine Immunol [Internet]*. 2017 Apr [cited 2023 Mar 19];24(4). Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CVI.00533-16>

70. Andrade BB, Reis-Filho A, Souza-Neto SM, Clarêncio J, Camargo LM, Barral A, et al. Severe *Plasmodium vivax* malaria exhibits marked inflammatory imbalance. *Malar J*. 2010 Dec;9(1):13.
71. Lyke KE, Burges R, Cissoko Y, Sangare L, Dao M, Diarra I, et al. Serum Levels of the Proinflammatory Cytokines Interleukin-1 Beta (IL-beta), IL-6, IL-8, IL-10, Tumor Necrosis Factor Alpha, and IL-12(p70) in Malian Children with Severe *Plasmodium falciparum* Malaria and Matched Uncomplicated Malaria or Healthy Controls. *INFECT IMMUN*. 2004;72.
72. Bhargava M, Viken K, Wang Q, Jagtap P, Bitterman P, Ingbar D, et al. Bronchoalveolar Lavage Fluid Protein Expression in Acute Respiratory Distress Syndrome Provides Insights into Pathways Activated in Subjects with Different Outcomes. *Sci Rep*. 2017 Aug 7;7(1):7464.
73. Deroost K, Tyberghein A, Lays N, Noppen S, Schwarzer E, Vanstreels E, et al. Hemozoin Induces Lung Inflammation and Correlates with Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2013 May;48(5):589–600.
74. Gun SY, Claser C, Tan KSW, Rénia L. Interferons and Interferon Regulatory Factors in Malaria. *Mediators of Inflammation*. 2014;2014:1–21.
75. King T, Lamb T. Interferon- $\gamma$ : The Jekyll and Hyde of Malaria. Knoll LJ, editor. *PLoS Pathog*. 2015 Oct 1;11(10):e1005118.
76. Claser C, Nguee SYT, Balachander A, Wu Howland S, Becht E, Gunasegaran B, et al. Lung endothelial cell antigen cross-presentation to CD8+T cells drives malaria-associated lung injury. *Nat Commun*. 2019 Sep 18;10(1):4241.
77. Galvão-Filho B, de Castro JT, Figueiredo MM, Rosmaninho CG, Antonelli LR do V, Gazzinelli RT. The emergence of pathogenic TNF/iNOS producing dendritic cells (Tip-DCs) in a malaria model of acute respiratory distress syndrome (ARDS) is dependent on CCR4. *Mucosal Immunology*. 2019 Mar;12(2):312–22.
78. Plewes K, Kingston HWF, Ghose A, Maude RJ, Herdman MT, Leopold SJ, et al. Cell-free hemoglobin mediated oxidative stress is associated with acute kidney injury and renal replacement therapy in severe *falciparum* malaria: an observational study. *BMC Infect Dis*. 2017 Dec;17(1):313.
79. del Portillo HA, Ferrer M, Brugat T, Martin-Jaular L, Langhorne J, Lacerda MVG. The role of the spleen in malaria: Role of the spleen in malaria. *Cellular Microbiology*. 2012 Mar;14(3):343–55.
80. Buffet PA, Safeukui I, Deplaine G, Brousse V, Prendki V, Thellier M, et al. The pathogenesis of *Plasmodium falciparum* malaria in humans: insights from splenic physiology. *Blood*. 2011 Jan 13;117(2):381–92.
81. Craig AG, Grau GE, Janse C, Kazura JW, Milner D, Barnwell JW, et al. The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. *PLoS Pathog*. 2012 Feb 2;8(2):e1002401.

82. Brant F, Miranda AS, Esper L, Gualdrón-López M, Cisalpino D, de Souza D da G, et al. Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016 May;54:73–85.
83. Lagassé HAD, Anidi IU, Craig JM, Limjunyawong N, Poupore AK, Mitzner W, et al. Recruited monocytes modulate malaria-induced lung injury through CD36-mediated clearance of sequestered infected erythrocytes. *Journal of Leukocyte Biology*. 2016 May 1;99(5):659–71.
84. Hirako IC, Ataide MA, Faustino L, Assis PA, Sorensen EW, Ueta H, et al. Splenic differentiation and emergence of CCR5+CXCL9+CXCL10+ monocyte-derived dendritic cells in the brain during cerebral malaria. *Nat Commun*. 2016 Nov 3;7(1):13277.
85. Freitas do Rosario AP, Langhorne J. T cell-derived IL-10 and its impact on the regulation of host responses during malaria. *International Journal for Parasitology*. 2012 May;42(6):549–55.
86. Nakamae S, Kimura D, Miyakoda M, Sukhbaatar O, Inoue SI, Yui K. Role of IL-10 in inhibiting protective immune responses against infection with heterologous *Plasmodium* parasites. *Parasitology International*. 2019 Jun;70:5–15.
87. Kavishe RA, Koenderink JB, Alifrangis M. Oxidative stress in malaria and artemisinin combination therapy: Pros and Cons. *FEBS J*. 2017 Aug;284(16):2579–91.
88. Srivastava P, Puri SK, Kamboj KK, Pandey VC. Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. *Trop Med Int Health*. 1999 Apr;4(4):251–4.
89. Cui L, Su X zhuan. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert Review of Anti-infective Therapy*. 2009 Oct;7(8):999–1013.
90. Arreesrisom P, Dondorp AM, Looareesuwan S, Udomsangpetch R. Suppressive effects of the anti-oxidant N-acetylcysteine on the anti-malarial activity of artesunate. *Parasitology International*. 2007 Sep;56(3):221–6.
91. OM A, AB O, OG A. Effect of antimalarial drugs and malaria infection on oxidative stress in pregnant Women. 2010;
92. Braga CB e, Martins AC, Cayotopa ADE, Klein WW, Schlosser AR, Silva AF da, et al. Side Effects of Chloroquine and Primaquine and Symptom Reduction in Malaria Endemic Area (Mâncio Lima, Acre, Brazil). *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2015;2015:1–7.
93. WHO. Guidelines for the treatment of malaria [Internet]. 3rd ed. Geneva: World Health Organization; 2015. 313 p. Available from: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/162441>
94. Tristano AG, Falcón L, Willson M, de Oca IM. Seizure associated with chloroquine therapy in a patient with systemic lupus erythematosus. *Rheumatol Int*. 2004 Sep;24(5):315–6.

95. Al-Bari MdAA. Chloroquine analogues in drug discovery: new directions of uses, mechanisms of actions and toxic manifestations from malaria to multifarious diseases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2015 Jun 1;70(6):1608–21.
96. Soentjens P, Delanote M, Van Gompel A. Mefloquine-Induced Pneumonitis. *J Travel Med*. 2006 May 1;13(3):172–4.
97. Vogel A. Darstellung von Benzoesäure aus der Tonka-Bohne und aus den Meliloten - oder Steinklee - Blumen. *Ann Phys phys Chem*. 1820;64(2):161–6.
98. Dean FM. Naturally Occurring Coumarins. In: Zechmeister L, editor. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe/Progress in the Chemistry of Organic Natural Products/Progrès Dans La Chimie Des Substances Organiques Naturelles* [Internet]. Vienna: Springer Vienna; 1952 [cited 2023 Mar 29]. p. 225–91. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-7169-1\\_6](http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-7169-1_6)
99. Murray RDH. *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* [Internet]. Herz W, Falk H, Kirby GW, Moore RE, editors. Vienna: Springer Vienna; 2002 [cited 2023 Mar 29]. (Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; vol. 83). Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-7091-6172-2>
100. Srivastav VK, Egbuna C, Tiwari M. Plant secondary metabolites as lead compounds for the production of potent drugs. In: *Phytochemicals as Lead Compounds for New Drug Discovery* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2023 Mar 29]. p. 3–14. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128178904000019>
101. Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, López-Jornet P, Lopez EPF, Harun N, Yeskaliyeva B, et al. Natural Coumarins: Exploring the Pharmacological Complexity and Underlying Molecular Mechanisms. Gil G, editor. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2021 Aug 23;2021:1–19.
102. BATTERY RG, Ling LC, Bean MM. Coumarin off-odor in wheat flour. *J Agric Food Chem*. 1978 Jan;26(1):179–80.
103. Blahová J, Svobodová Z. Assessment of Coumarin Levels in Ground Cinnamon Available in the Czech Retail Market. *The Scientific World Journal*. 2012;2012:1–4.
104. Leal LKAM, Ferreira AAG, Bezerra GA, Matos FJA, Viana GSB. Antinociceptive, anti-inflammatory and bronchodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. *Journal of Ethnopharmacology*. 2000 May;70(2):151–9.
105. Poonam V, Raunak, Kumar G, S. Reddy L. C, Jain R, K. Sharma S, et al. Chemical Constituents of the Genus *Prunus* and their Medicinal Properties. *CMC*. 2011 Sep 1;18(25):3758–824.

106. Menezes JCJMDS, Diederich MF. Natural dimers of coumarin, chalcones, and resveratrol and the link between structure and pharmacology. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019 Nov;182:111637.
107. Garg SS, Gupta J, Sharma S, Sahu D. An insight into the therapeutic applications of coumarin compounds and their mechanisms of action. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2020 Sep;152:105424.
108. Stefanachi A, Leonetti F, Pisani L, Catto M, Carotti A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules*. 2018 Jan 27;23(2):250.
109. Annunziata F, Pinna C, Dallavalle S, Tamborini L, Pinto A. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *Int J Mol Sci*. 2020 Jun 29;21(13):4618.
110. Melagraki G, Afantitis A, Igglessi-Markopoulou O, Detsi A, Koufaki M, Kontogiorgis C, et al. Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activity of novel coumarin-3-aminoamides and their alpha-lipoic acid adducts. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2009 Jul;44(7):3020–6.
111. Prasad YR, Kumar PR, Deepti ChA, Ramana MV. Synthesis and Antimicrobial Activity of Some Novel Chalcones of 2-Hydroxy -1-Acetonaphthone and 3-Acetyl Coumarin. *E-Journal of Chemistry*. 2006;3(4):236–41.
112. Amin KM, Rahman DEA, Al-Eryani YA. Synthesis and preliminary evaluation of some substituted coumarins as anticonvulsant agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2008 May;16(10):5377–88.
113. Yadav N, Agarwal D, Kumar S, Dixit AK, Gupta RD, Awasthi SK. In vitro antiplasmodial efficacy of synthetic coumarin-triazole analogs. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2018 Feb;145:735–45.
114. Bedoya LM, Beltrán M, Sancho R, Olmedo DA, Sánchez-Palomino S, del Olmo E, et al. 4-Phenylcoumarins as HIV transcription inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2005 Oct;15(20):4447–50.
115. Yuan C, Wang MH, Wang F, Chen PY, Ke XG, Yu B, et al. Network pharmacology and molecular docking reveal the mechanism of Scopoletin against non-small cell lung cancer. *Life Sciences*. 2021 Apr;270:119105.
116. Yang D, Gu T, Wang T, Tang Q, Ma C. Effects of Osthole on Migration and Invasion in Breast Cancer Cells. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2010 Jul 23;74(7):1430–4.
117. Aloi E, Rizzuti B, Guzzi R, Bartucci R. Binding of warfarin differently affects the thermal behavior and chain packing of anionic, zwitterionic and cationic lipid membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 2020 Nov;694:108599.
118. Matos MJ, Rodríguez-Enríquez F, Borges F, Santana L, Uriarte E, Estrada M, et al. 3-Amidocoumarins as Potential Multifunctional Agents against Neurodegenerative Diseases. *ChemMedChem*. 2015 Dec;10(12):2071–9.

119. Sun M, Hu J, Song X, Wu D, Kong L, Sun Y, et al. Coumarin derivatives protect against ischemic brain injury in rats. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013 Sep;67:39–53.
120. Garino C, Pietrancosta N, Laras Y, Moret V, Rolland A, Quéléver G, et al. BACE-1 inhibitory activities of new substituted phenyl-piperazine coupled to various heterocycles: Chromene, coumarin and quinoline. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2006 Apr;16(7):1995–9.
121. Matos MJ, Vilar S, Gonzalez-Franco RM, Uriarte E, Santana L, Friedman C, et al. Novel (coumarin-3-yl)carbamates as selective MAO-B inhibitors: Synthesis, in vitro and in vivo assays, theoretical evaluation of ADME properties and docking study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013 May;63:151–61.
122. Yun BS, Lee IK, Ryoo IJ, Yoo ID. Coumarins with Monoamine Oxidase Inhibitory Activity and Antioxidative Coumarino-lignans from *Hibiscus s yriacus*. *J Nat Prod*. 2001 Sep 1;64(9):1238–40.
123. Rodríguez-Enríquez F, Viña D, Uriarte E, Laguna R, Matos MJ. 7-Amidocoumarins as Multitarget Agents against Neurodegenerative Diseases: Substitution Pattern Modulation. *ChemMedChem*. 2021 Jan 8;16(1):179–86.
124. Matos MJ, Novo P, Mayán L, Torres I, Uriarte E, Yáñez M, et al. 8-Amide and 8-carbamate substitution patterns as modulators of 7-hydroxy-4-methylcoumarin's antidepressant profile: Synthesis, biological evaluation and docking studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2023 Feb;248:115091.
125. Huang M, Xie SS, Jiang N, Lan JS, Kong LY, Wang XB. Multifunctional coumarin derivatives: Monoamine oxidase B (MAO-B) inhibition, anti- $\beta$ -amyloid ( $A\beta$ ) aggregation and metal chelation properties against Alzheimer's disease. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 2015 Feb;25(3):508–13.
126. Synthesis and antimalarial activity of sulfonamide-attached coumarin-[1,2,3]-triazoles. *IJCB [Internet]*. 2020 Nov 11 [cited 2023 Apr 27];59(10). Available from: <http://op.niscpr.res.in/index.php/IJCB/article/view/35492>
127. Cuellar JE, Quiñones W, Robledo S, Gil J, Durango D. Coumaro-chalcones synthesized under solvent-free conditions as potential agents against malaria, leishmania and trypanosomiasis. *Heliyon*. 2022 Feb;8(2):e08939.
128. Brant F, Miranda AS, Esper L, Rodrigues DH, Kangussu LM, Bonaventura D, et al. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Immune Response Profile and Development of Pathology during *Plasmodium berghei* Anka Infection. Adams JH, editor. *Infect Immun*. 2014 Aug;82(8):3127–40.
129. Carroll RW, Wainwright MS, Kim KY, Kidambi T, Gómez ND, Taylor T, et al. A Rapid Murine Coma and Behavior Scale for Quantitative Assessment of Murine Cerebral Malaria. Sinnis P, editor. *PLoS ONE*. 2010 Oct 1;5(10):e13124.
130. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia*. 1968;13(3):222–57.

131. Rogers DC, Fisher EMC, Brown SDM, Peters J, Hunter AJ, Martin JE. Behavioral and functional analysis of mouse phenotype: SHIRPA, a proposed protocol for comprehensive phenotype assessment. *Mammalian Genome*. 1997 Oct 1;8(10):711–3.
132. Rogers DC, Peters J, Martin JE, Ball S, Nicholson SJ, Witherden AS, et al. SHIRPA, a protocol for behavioral assessment: validation for longitudinal study of neurological dysfunction in mice. *Neuroscience Letters*. 2001 Jun 22;306(1):89–92.
133. Desruisseaux MS, Gulinello M, Smith DN, Lee SC, Tsuji M, Weiss LM, et al. Cognitive Dysfunction in Mice Infected with *Plasmodium berghei* Strain ANKA. *J INFECT DIS*. 2008 Jun;197(11):1621–7.
134. Matos MJ, Vilar S, Gonzalez-Franco RM, Uriarte E, Santana L, Friedman C, et al. Novel (coumarin-3-yl)carbamates as selective MAO-B inhibitors: Synthesis, in vitro and in vivo assays, theoretical evaluation of ADME properties and docking study. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2013 May;63:151–61.
135. Russo RC, Savino B, Mirolo M, Buracchi C, Germano G, Anselmo A, et al. The atypical chemokine receptor ACKR2 drives pulmonary fibrosis by tuning influx of CCR2<sup>+</sup> and CCR5<sup>+</sup> IFN $\gamma$ -producing  $\gamma\delta$ T cells in mice. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2018 Jun 1;314(6):L1010–25.
136. Resende NM, Gazzinelli-Guimarães PH, Barbosa FS, Oliveira LM, Nogueira DS, Gazzinelli-Guimarães AC, et al. New insights into the immunopathology of early *Toxocara canis* infection in mice. *Parasites & Vectors*. 2015 Jul 2;8(1):354.
137. Dwivedi AP, Kumar S, Varshney V, Singh AB, Srivastava AK, Sahu DP. Synthesis and antihyperglycemic activity of novel N-acyl-2-arylethylamines and N-acyl-3-coumarylamines. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 2008;18(7):2301–5.
138. Zekar L, Sharman T. *Plasmodium Falciparum Malaria* [Internet]. StatPearls [Internet]. StatPearls Publishing; 2022. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555962/>
139. Demissie Y, Ketema T. Complicated malaria symptoms associated with *Plasmodium vivax* among patients visiting health facilities in Mendi town, Northwest Ethiopia. *BMC Infect Dis*. 2016 Dec;16(1):436.
140. Moon HI, Lee JH, Lee YC, Kim KS. Antiplasmodial and cytotoxic activity of coumarin derivatives from dried roots of *Angelica gigas* Nakai in vitro. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*. 2011 Dec;33(4):663–6.
141. Demissie Y, Ketema T. Complicated malaria symptoms associated with *Plasmodium vivax* among patients visiting health facilities in Mendi town, Northwest Ethiopia. *BMC Infectious Diseases*. 2016;16(1):1–8.
142. Sinha S, Mukherji A, Chandrakar S. Hypokalaemic paralysis in an adult case of *Plasmodium vivax* malaria. *Malaria Journal*. 2013;12(1):1.

143. Bartoloni A, Zammarchi L. Clinical aspects of uncomplicated and severe malaria. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 2012;4(1).
144. Dai M, Reznik SE, Spray DC, Weiss LM, Tanowitz HB, Gulinello M, et al. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Microbes and Infection*. 2010 Dec;12(14–15):1198–207.
145. Ndyomugenyi R, Magnussen P, Clarke S. Diagnosis and treatment of malaria in peripheral health facilities in Uganda: Findings from an area of low transmission in south-western Uganda. *Malaria Journal*. 2007;6:1–8.
146. Minxian Dai, Sandra E. Reznik, David C. Spray, Louis M. Weiss, Herbert B. Tanowitz, Maria Gulinello and MSD. Persistent cognitive and motor deficits after successful antimalarial treatment in murine cerebral malaria. *Bone*. 2010;23(1):1–7.
147. Jain K, Sood S, Gowthamarajan K. Modulation of cerebral malaria by curcumin as an adjunctive therapy. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. 2013;17(5):579–91.
148. Davis SN, Wu P, Camci ED, Simon JA, Rubel EW, Raible DW. Chloroquine kills hair cells in zebrafish lateral line and murine cochlear cultures: Implications for ototoxicity. *Hearing Research*. 2020 Sep;395:108019.
149. Kurach Ł, Kulczycka-Mamona S, Kowalczyk J, Skalicka-Woźniak K, Boguszewska-Czubara A, El Sayed N, et al. Mechanisms of the Procognitive Effects of Xanthotoxin and Umbelliferone on LPS-Induced Amnesia in Mice. *IJMS*. 2021 Feb 10;22(4):1779.
150. Xie SS, Wang X, Jiang N, Yu W, Wang KDG, Lan JS, et al. Multi-target tacrine-coumarin hybrids: Cholinesterase and monoamine oxidase B inhibition properties against Alzheimer's disease. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2015 May;95:153–65.
151. Skalicka-Woźniak K, Orhan IE, Cordell GA, Nabavi SM, Budzyńska B. Implication of coumarins towards central nervous system disorders. *Pharmacological Research*. 2016 Jan;103:188–203.
152. Traykova M, Kostova I. Coumarin Derivatives and Oxidative Stress. *International J of Pharmacology*. 2004 Dec 15;1(1):29–32.
153. Mogana R, Teng-Jin K, Wiart C. Anti-Inflammatory, Anticholinesterase, and Antioxidant Potential of Scopoletin Isolated from *Canarium patentinervium* Miq. (Burseraceae Kunth). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2013;2013:1–7.
154. Vasquez M, Zuniga M, Rodriguez A. Oxidative Stress and Pathogenesis in Malaria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Nov 30;11:768182.
155. Frimpong A, Amponsah J, Adjokatseh AS, Agyemang D, Bentum-Ennin L, Ofori EA, et al. Asymptomatic Malaria Infection Is Maintained by a Balanced Pro- and Anti-inflammatory Response. *Front Microbiol*. 2020 Nov 17;11:559255.

156. Figarella K, Wolburg H, Garaschuk O, Duzsenko M. Microglia in neuropathology caused by protozoan parasites. *Biological Reviews*. 2020;95(2):333–49.
157. Eyo UB, Murugan M, Long-Jun W. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy Ukpong. *Glia*. 2017;65(1):1–26.
158. Ransohoff RM, El Khoury J. Microglia in health and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2016;8(1):1–15.
159. Spanos JP, Hsu NJ, Jacobs M. Microglia are crucial regulators of neuro-immunity during central nervous system tuberculosis. *Front Cell Neurosci* [Internet]. 2015 May 18 [cited 2023 Feb 8];9. Available from: [http://www.frontiersin.org/Cellular\\_Neuroscience/10.3389/fncel.2015.00182/abstract](http://www.frontiersin.org/Cellular_Neuroscience/10.3389/fncel.2015.00182/abstract)
160. Singh N, Sundar S. Combined neutralization of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha induces IL-4 production but has no direct additive impact on parasite burden in splenic cultures of human visceral leishmaniasis. Rafati S, editor. *PLoS ONE*. 2018 Jun 28;13(6):e0199817.
161. Brant F, Miranda AS, Esper L, Gualdrón-López M, Cisalpino D, de Souza D da G, et al. Suppressor of cytokine signaling 2 modulates the immune response profile and development of experimental cerebral malaria. *Brain, Behavior, and Immunity*. 2016;54:73–85.
162. Walther M, Woodruff J, Edele F, Jeffries D, Tongren JE, King E, et al. Innate Immune Responses to Human Malaria: Heterogeneous Cytokine Responses to Blood-Stage *Plasmodium falciparum* Correlate with Parasitological and Clinical Outcomes. *The Journal of Immunology*. 2006;177(8):5736–45.
163. Cruz LN, Wu Y, Ulrich H, Craig AG, Garcia CRS. Tumor necrosis factor reduces *Plasmodium falciparum* growth and activates calcium signaling in human malaria parasites. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*. 2016;1860(7):1489–97.
164. Hirako IC, Assis PA, Galvão-Filho B, Luster AD, Antonelli LR, Gazzinelli RT. Monocyte-derived dendritic cells in malaria. *Current Opinion in Microbiology*. 2019 Dec;52:139–50.
165. Swanson PA, Hart GT, Russo MV, Nayak D, Yazew T, Peña M, et al. CD8+ T Cells Induce Fatal Brainstem Pathology during Cerebral Malaria via Luminal Antigen-Specific Engagement of Brain Vasculature. Hunter CA, editor. *PLoS Pathog*. 2016 Dec 1;12(12):e1006022.
166. Niewold P, Cohen A, van Vreden C, Getts DR, Grau GE, King NJC. Experimental severe malaria is resolved by targeting newly-identified monocyte subsets using immune-modifying particles combined with artesunate. *Commun Biol*. 2018 Dec 13;1(1):227.
167. Marquet S, Conte I, Poudiougou B, Argiro L, Cabantous S, Dessein H, et al. The IL17F and IL17RA Genetic Variants Increase Risk of Cerebral Malaria in Two African Populations. Adams JH, editor. *Infect Immun*. 2016 Feb;84(2):590–7.

168. Raballah E, Kempaiah P, Karim Z, Orinda GO, Otieno MF, Perkins DJ, et al. CD4 T-cell expression of IFN- $\gamma$  and IL-17 in pediatric malarial anemia. Luty AJF, editor. PLoS ONE. 2017 Apr 20;12(4):e0175864.
169. Villegas-Mendez A, Greig R, Shaw TN, de Souza JB, Gwyer Findlay E, Stumhofer JS, et al. IFN- $\gamma$ -Producing CD4+ T Cells Promote Experimental Cerebral Malaria by Modulating CD8+ T Cell Accumulation within the Brain. *The Journal of Immunology*. 2012 Jul 15;189(2):968–79.
170. Monteiro S, Ferreira FM, Pinto V, Roque S, Morais M, de Sá-Calçada D, et al. Absence of IFN $\gamma$  promotes hippocampal plasticity and enhances cognitive performance. *Transl Psychiatry*. 2016 Jan 5;6(1):e707–e707.
171. Aitken EH, Negri EM, Barboza R, Lima MR, Álvarez JM, Marinho CR, et al. Ultrastructure of the lung in a murine model of malaria-associated acute lung injury/acute respiratory distress syndrome. *Malar J*. 2014 Dec;13(1):230.
172. Ghosh R, Singha PS, Das LK, Ghosh D, Firdaus SB. Anti-inflammatory activity of natural coumarin compounds from plants of the Indo-Gangetic plain. *AIMSMOLES*. 2023;10(2):79–98.
173. Plirat W, Chaniad P, Phuwajaroanpong A, Septama AW, Punsawad C. Phytochemical, Antimalarial, and Acute Oral Toxicity Properties of Selected Crude Extracts of PrabchompoothawEEP Remedy in Plasmodium berghei-Infected Mice. *TropicalMed*. 2022 Nov 23;7(12):395.
174. Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Advances in Wound Care*. 2020 Apr 1;9(4):184–98.
175. Kumar R, Ng S, Engwerda C. The role of IL-10 in malaria: A double edged sword. *Frontiers in Immunology*. 2019;10(FEB):1–10.
176. Nakamae S, Kimura D, Miyakoda M, Sukhbaatar O, Inoue SI, Yui K. Role of IL-10 in inhibiting protective immune responses against infection with heterologous Plasmodium parasites. *Parasitology International*. 2019;70(January):5–15.
177. Steen EH, Wang X, Balaji S, Butte MJ, Bollyky PL, Keswani SG. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Advances in Wound Care*. 2020;9(4):184–98.
178. Li Q, Gu Y, Tu Q, Wang K, Gu X, Ren T. Blockade of Interleukin-17 Restrains the Development of Acute Lung Injury. *Scandinavian Journal of Immunology*. 2016;83(3):203–11.
179. Yan Z, Xiaoyu Z, Zhixin S, Di Q, Xinyu D, Jing X, et al. Rapamycin attenuates acute lung injury induced by LPS through inhibition of Th17 cell proliferation in mice. *Scientific Reports*. 2016;6(December 2015):1–11.
180. Murdock BJ, Huffnagle GB, Olszewski MA, Osterholzer JJ. Interleukin-17A Enhances Host Defense against Cryptococcal Lung Infection through Effects

- Mediated by Leukocyte Recruitment, Activation, and Gamma Interferon Production. Deepe GS, editor. *Infect Immun*. 2014 Mar;82(3):937–48.
181. Murakami T, Hatano S, Yamada H, Iwakura Y, Yoshikai Y. Two Types of Interleukin 17A–Producing  $\gamma\delta$  T Cells in Protection Against Pulmonary Infection With *Klebsiella pneumoniae*. *J Infect Dis*. 2016 Dec 1;214(11):1752–61.
182. Wang H, Li S, Cui Z, Qin T, Shi H, Ma J, et al. Analysis of spleen histopathology, splenocyte composition and haematological parameters in four strains of mice infected with *Plasmodium berghei* K173. *Malar J*. 2021 Dec;20(1):249.
183. Mekonnen DA, Abadura GS, Behaksra SW, Taffese HS, Bayissa GA, Bulto MG, et al. Treatment of uncomplicated *Plasmodium vivax* with chloroquine plus radical cure with primaquine without G6PDd testing is safe in Arba Minch, Ethiopia: assessment of clinical and parasitological response. *Malar J*. 2023 Apr 25;22(1):135.
184. Macedo TS, Villarreal W, Couto CC, Moreira DRM, Navarro M, Machado M, et al. Platinum(II)–chloroquine complexes are antimalarial agents against blood and liver stages by impairing mitochondrial function. *Metallomics*. 2017;9(11):1548–61.
185. Jamialahmadi K, Amiri AH, Zahedipour F, Faraji F, Karimi G. Protective Effects of Auraptene against Free Radical-Induced Erythrocytes Damage. *J Pharmacopuncture*. 2022 Dec 31;25(4):344–53.
186. Gupta S, Khan J, Kumari P, Narayana C, Ayana R, Chakrabarti M, et al. Enhanced uptake, high selective and microtubule disrupting activity of carbohydrate fused pyrano-pyranones derived from natural coumarins attributes to its anti-malarial potential. *Malar J*. 2019 Dec;18(1):346.

# Anexo

## Article

# *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide Promotes Immunomodulatory, Neuroprotective, and Lung Function-Preserving Effects during Severe Malaria

Paulo Gaio <sup>1</sup>, Allysson Cramer <sup>1</sup>, Natália Fernanda de Melo Oliveira <sup>1</sup>, Samuel Porto <sup>1</sup>, Lucas Kramer <sup>1</sup>, Rayane Aparecida Nonato Rabelo <sup>1</sup>, Rafaela das Dores Pereira <sup>1</sup>, Laura Lis de Oliveira Santos <sup>1</sup>, César Luís Nascimento Barbosa <sup>2</sup>, Fabrício Marcus Silva Oliveira <sup>3</sup>, Mauro Martins Teixeira <sup>1,2</sup>, Remo Castro Russo <sup>4</sup>, Maria João Matos <sup>5,\*</sup> and Fabiana Simão Machado <sup>1,2,\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Science, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; paulogaioleite@gmail.com (P.G.); cramer.allysson@gmail.com (A.C.); melonataliaf@gmail.com (N.F.d.M.O.); samuel.porto192@gmail.com (S.P.); lucasimunologia@gmail.com (L.K.); rayane.rabelo10@gmail.com (R.A.N.R.); rafaelapereiranutri@gmail.com (R.d.D.P.); lauralis.oli@gmail.com (L.L.d.O.S.); mmtex.ufmg@gmail.com (M.M.T.)

<sup>2</sup> Program in Health Sciences, Infectious Diseases and Tropical Medicine/Interdisciplinary Laboratory of Medical Investigation, Faculty of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, MG, Brazil; cesarbarbosa\_91@yahoo.com.br

<sup>3</sup> Cellular and Molecular Immunology Group, René Rachou Institute, Oswald o Cruz Foundation—FIOCRUZ, Belo Horizonte 30190-002, MG, Brazil; oliveirafms13@gmail.com

<sup>4</sup> Laboratory of Pulmonary Immunology and Mechanics, Department of Physiology and Biophysics, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil; russorc@gmail.com

<sup>5</sup> Departamento de Química Orgánica, Facultad de Farmacia, Universidad de Santiago de Compostela, 15782 Santiago de Compostela, Spain

\* Correspondence: mariajoao.correiapinto@usc.es (M.J.M.); machadofs@icb.ufmg.br (F.S.M.)

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Gaio, P.; Cramer, A.; de Melo Oliveira, N.F.; Porto, S.; Kramer, L.; Nonato Rabelo, R.A.; Pereira, R.d.D.; de Oliveira Santos, L.L.; Nascimento Barbosa, C.L.; Silva Oliveira, F.M.; et al.

*N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide Promotes Immunomodulatory, Neuroprotective, and Lung Function-Preserving Effects during Severe Malaria. *Pharmaceuticals* **2024**, *17*, 46. <https://doi.org/10.3390/ph17010046>

Academic Editors: María del Carmen Terán Moldes and Pedro Besada Pereira

Received: 1 December 2023

Revised: 21 December 2023

Accepted: 22 December 2023

Published: 27 December 2023

**Abstract:** *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) infection in mice resembles several aspects of severe malaria in humans, such as cerebral malaria and acute respiratory distress syndrome. Herein, the effects of *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220) against severe experimental malaria have been investigated. Treatment with M220 proved to protect cognitive abilities and lung function in PbA-infected mice, observed by an object recognition test and spirometry, respectively. In addition, treated mice demonstrated decreased levels of brain and lung inflammation. The production and accumulation of microglia, and immune cells that produce the inflammatory cytokines TNF and IFN- $\gamma$ , decreased, while the production of the anti-inflammatory cytokine IL-10 by innate and adaptive immune cells was enhanced. Treatment with M220 promotes immunomodulatory, neuroprotective, and lung function-preserving effects during experimental severe malaria. Therefore, it may be an interesting therapeutic candidate to treat severe malaria effects.

**Keywords:** *Plasmodium berghei* ANKA; *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide; immunoregulation; cerebral malaria; acute respiratory distress syndrome



**Copyright:** © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Malaria is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, which includes at least five species known to infect humans: *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale*, and *P. knowlesi* [1]. It is a very severe disease that can manifest as severe anemia, with pulmonary complications that can lead to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and cerebral malaria (CM) [2,3]. CM caused by *P. falciparum* is a neglected infectious disease, and the leading cause of morbidity and mortality in 91 endemic countries [4]. In 2021, the

World Health Organization (WHO) reported more than 247 million cases of malaria, and 627 thousand deaths worldwide [4].

Animal models that mimic aspects of human malaria and allow pharmacological and therapeutic studies contribute to elucidating several questions related to *Plasmodium* spp. and humans [5]. Mice infected with *P. berghei* ANKA (PbA) simulate human CM and ARDS. Therefore, it is a murine model widely used to study the development and course of severe malaria [6].

During *Plasmodium* infection, innate immunity acts as the first line of host defense by controlling parasite growth and regulating the development of adaptive immunity and immunological memory [7]. Antigen-presenting myeloid cells, such as dendritic cells (DCs) and macrophages, recognize the parasite, leading to an immune response mediated by Toll-like receptors, amongst others [8]. DCs and macrophages produce a wide range of pro-inflammatory cytokines, including TNF, IL-12, and IL-6, as well as chemokines such as CXCR3 [9], CCL2, CXCL8, and CXCL10 [10], and CD4 T lymphocytes that mainly produce IFN- $\gamma$ . These cytokines and chemokines have been associated with the susceptibility to cerebral and pulmonary malaria pathogenesis [11,12]. High levels of IFN- $\gamma$  and TNF contribute to the development of CM [7,13] and pulmonary dysfunction, inducing chemokines that stimulate T lymphocytes and other leukocytes to migrate, such as Ly6C<sup>hi</sup> monocytes, which contributes to severe damage to the brain and lungs [14]. In contrast, anti-inflammatory cytokines such as IL-10 control inflammatory responses, preventing tissue damage [15], and playing a protective role in experimental PbA-induced CM [16].

Medicines available for malaria include artemisinin, chloroquine (CQ), and mefloquine, which are effective drugs in combating malaria parasites and relieving patients' pain and fever [17]. The disadvantage of these treatments is that their action is often limited to the blood phase of the disease, being ineffective in the liver phase [18,19]. Also, CQ can cause seizures in patients with epilepsy and systemic lupus erythematosus [20]. Antimalarial treatments can also cause lung dysfunction and do not guarantee protection against brain damage [21,22]. Therefore, it is urgent to identify less toxic therapeutic options against malaria.

Coumarins are common plant metabolites, and very interesting due to their pharmacological activities [23,24]. Owing to their simple and versatile structure, and chemical stability, coumarins can be easily synthesized and modified to allow more active and selective compounds [25]. When adequately substituted, they can exert various activities, including antioxidant, anti-inflammatory, and neuroprotective effects [26,27]. Changes to the scaffold make coumarins potentially efficient in treating neurodegenerative diseases [25]. Amide-functionalized coumarins have already proven to be potent molecules against these diseases, particularly in pathologies in which monoamine oxidases are involved, as well as acting as interesting neuroprotective agents [28–30]. Their profile as neuroprotective agents has been previously studied in neuronal cell cultures in the presence of hydrogen peroxide or lipoxygenase [28].

Our group has extensive experience in the design and synthesis of molecules with activity against neurodegenerative diseases, mainly Parkinson's and Alzheimer's diseases [26,28–30]. Some molecules have been described for their activity in *in vivo* models [28]. Their biological profile as neuroprotectors, able to cross the blood–brain barrier, inspired the study of these molecules in cerebral malaria in *in vivo* models. Based on previous studies, we hypothesized the therapeutic potential of differently substituted coumarins in treating severe experimental malaria, acting mainly as anti-inflammatory and neuroprotective agents.

From a first screening of a diverse set of synthesized coumarin-containing compounds, *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220) stood out. After a preliminary selection of differently substituted coumarins that previously showed neuroprotective properties, by incubating the compounds with PbA-infected red blood cells and analyzing cell viability and the number of infected red blood cells, this amide-functionalized coumarin (M220) was selected for the present study as the most promising compound. After the first impressive

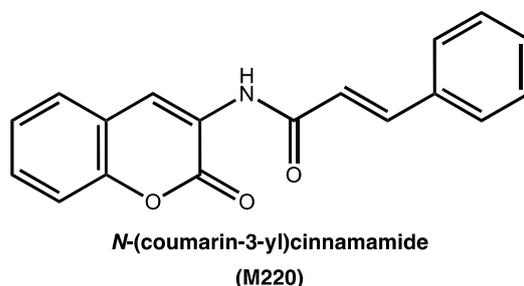
results of the novel object recognition test, we decided to explore in depth the mechanisms involved in neuroprotection, subsequently expanding them to lung assays.

After exploring different trials, we demonstrate that M220 treatment reduces brain and lung injury, attenuating inflammation and tissue damage, and protecting mice from death. To further explore the potential of this molecule in combination with traditional antimalarial drugs, a combination with CQ (M220+CQ) has been studied. This can lead to a decrease in the CQ dose, avoiding several of its side effects. The administration of M220+CQ was shown to reduce the accumulation of microglia and leukocytes, and the production of inflammatory cytokines (TNF and IFN- $\gamma$ ), which are related to the upregulation of the anti-inflammatory and tissue-protective cytokine IL-10, mainly secreted by innate and adaptive immune cells. In general, the combination of M220 and CQ also promotes immunomodulatory, neuroprotective, and lung-sparing effects, being an interesting therapeutic approach to reduce the dose by combining a traditional drug with a potent neuro-lung protective agent.

## 2. Results

### 2.1. The synthesis of *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220)

The synthesis of M220 (Figure 1) has been performed in two different steps [31]. The first one includes the reduction of the nitro group of the commercially available 3-nitrocoumarin in hydrogen atmosphere, in the presence of ethanol and palladium catalyst, at room temperature, for five hours. After the reduction of the nitro group to the corresponding amine, the second step involves an amidation reaction using cinnamoyl chloride, pyridine, and dichloromethane, from zero degrees Celsius to room temperature, stirring overnight. After completing this protocol, the final product (M220) has been then characterized by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and mass spectroscopy (Supplementary Figure S1).

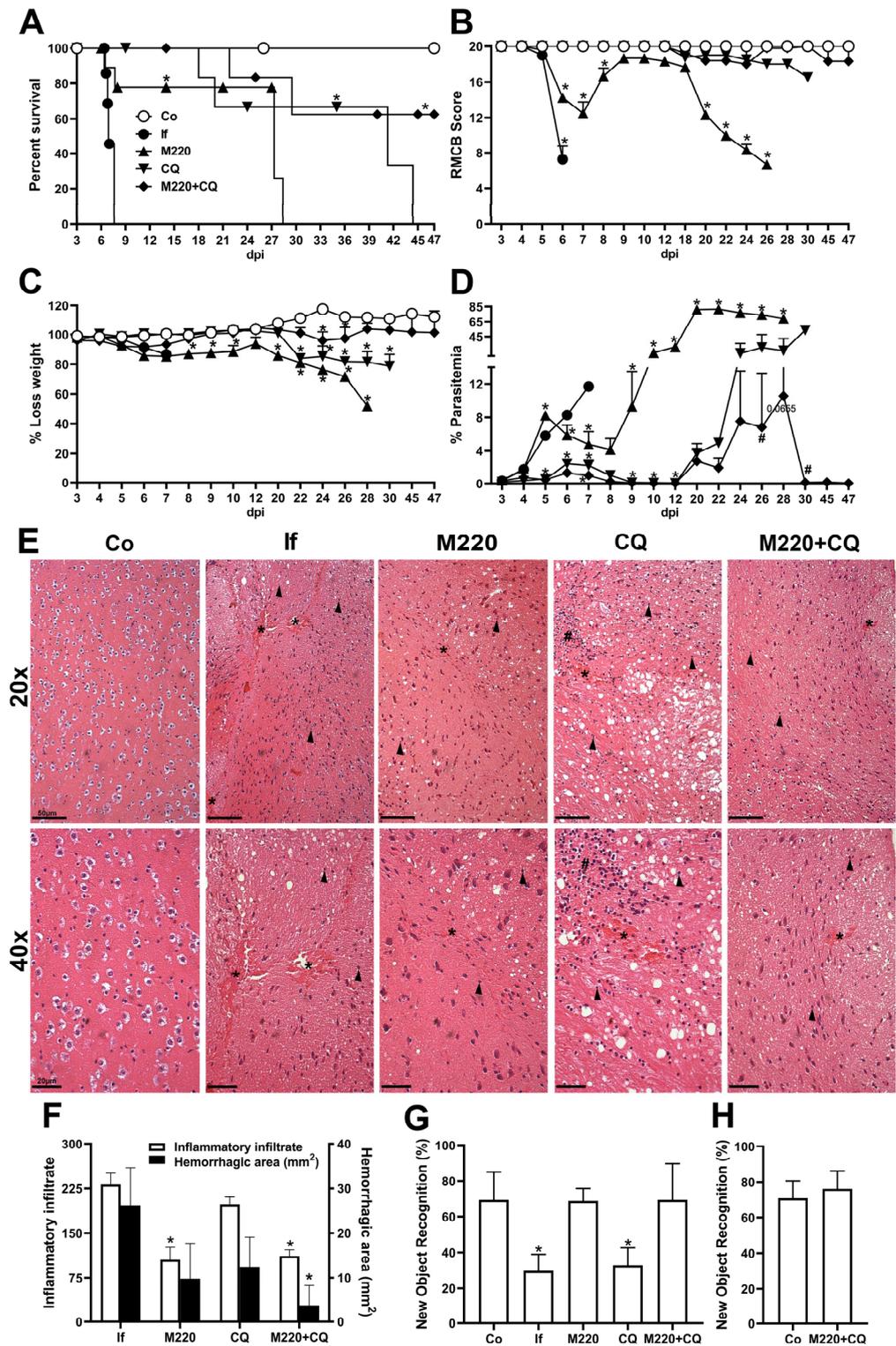


**Figure 1.** Chemical structure of *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220).

### 2.2. Administration of M220 Protects Mice from Mortality and Preserves Memory in *PbA*-Infected Mice

The effects of M220 during *PbA* infection were investigated by analyzing general and primary parameters, such as survival, RBMC score, weight loss, and parasitemia. We chose to start mice treatment on day 3, which is the time point when mice present parasitemia, but usually no neurological damage. These findings demonstrated that mice treated with M220 had a four-fold increase in survival compared with the untreated infected group (Figure 2A). Treatment with the combination of M220 and CQ (M220+CQ) was slightly more effective, significantly increasing survival five-fold (Figure 2A). After treatments were discontinued on day 12, mice treated with M220+CQ continued to exhibit superior clinical scores compared to the scores of mice in the other treatment groups (Figure 2B). Furthermore, mice treated with M220+CQ showed reduced weight loss compared to the M220- or CQ-treated groups (Figure 2C). Figure 2D–F show the effectiveness of each treatment in controlling parasitemia, brain inflammation, and damage. M220+CQ was significantly more effective than any other treatment. It was also able to improve recrudescence after treatment discontinuation. The novel object recognition test showed that untreated and CQ-treated infected mice significantly lost their cognitive ability five days post-infection (dpi) (Figure 2G). In contrast, mice treated with M220 or M220+CQ showed full ability to

recognize the novel object, similar to uninfected control mice (Figure 2G). Notably, representatives of the infected control and M220+CQ-treated groups who were still alive after 45 dpi were subjected to the new object recognition test again, demonstrating preserved cognitive ability (Figure 2H). These impressive results encouraged us to explore the mechanisms of action of M220.



**Figure 2.** M220 increases survival and efficiently preserves cognitive functions of PbA-infected mice. C57Bl/6 mice were intraperitoneally (i.p.) infected with  $1 \times 10^5$  erythrocytes parasitized with

PbA. Mice were treated with compound M220 (10 mg/kg) and/or CQ (30 mg/kg) via gavage, once a day, from 3 to 12 dpi. The following animal groups were created: uninfected (Co) mice that received only the vehicle; infected (If) mice that received only the vehicle; infected+M220 (M220); infected+CQ (CQ); infected+M220+CQ (M220+CQ). The following parameters have been evaluated: (A) survival, (B) clinical score using the rapid murine coma and behavior scale (RMCBS) parameter, (C) weight loss, (D) parasitemia. (E) Representative photomicrographs of H&E-stained brain sections (20× and 40×). Sections from an uninfected mouse with normal histological appearance (Co) and a PbA-infected mouse (If) showing multiple inflammatory infiltrates (arrow), bleeding areas (asterisks), and inflammatory foci (hashtag) at 5 dpi. In particular, treatment with M220+CQ reduced the brain injury observed at 5 dpi. The bars in the image represent 50 μm. (F) Hemorrhagic area (mm<sup>2</sup>) of brain tissue. (G) and (H) Cognitive assessment through object recognition test performed at 5 (G) and 47 (H) dpi. Data are representative of at least two independent experiments (4–6 mice/group) and shown as the mean ± SEM. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) with Dunnett's post-test, two-way ANOVA with Sidak's post-test, and a log-rank (Mantel–Cox) test. # for comparison of the CQ group vs. the M220+CQ group; \* for comparison of treated infected groups vs. untreated infected group. # or \*  $p < 0.05$ .

### 2.3. Administration of M220 Attenuates Lung Mechanical Dysfunction during PbA Infection in Mice

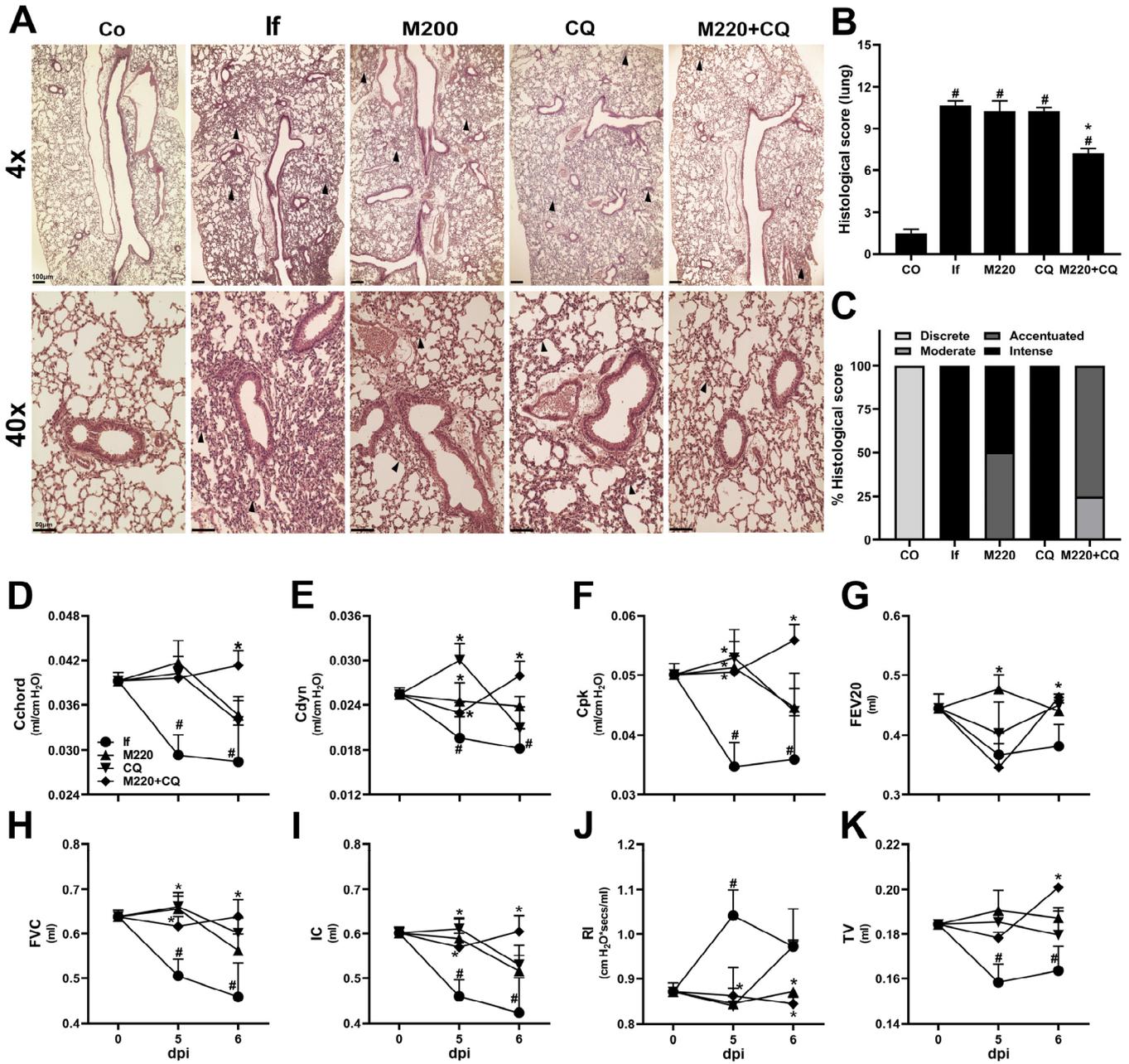
Along with the brain, the lungs are the organs most affected by severe malaria. Lung dysfunction affects approximately 20% of *P. falciparum* malaria cases [32] and involves several inflammatory processes [33]. Therefore, it was hypothesized that the treatments would also decrease lung inflammation and reverse lung dysfunction seen in severe malaria. Histological evaluation revealed increased cellular infiltration and intense inflammation in untreated mice infected with PbA at 6 dpi (Figure 3A–C). In contrast, mice in the M220+CQ-treated group showed reduced histological scores and reduced inflammation (Figure 3A–C). The evaluation of lung function showed a reflection of tissue inflammation and lung injury, which led to evident mechanical dysfunction, with RI markedly increased, a loss of all the distensibility parameters analyzed (Cchord, Cdyn, and CpK), reduced airway flow (FEV<sub>20</sub>), and low lung volumes (FVC, IC, and TV) in PbA-infected untreated mice. Treatments with M220 or CQ resulted in a modest improvement in lung function. However, treatment with M220+CQ significantly improved lung function, which normalized at 5 and 6 dpi (Figure 3D–K). Once again, the role of M220 in protecting the lungs from the side effects seen with antimalarials is very promising.

### 2.4. Effects of M220 on Brain Inflammation during PbA Infection in Mice

We next sought to determine whether modulation of brain and lung inflammation was the underlying mechanism by which compound M220 exerted its protective effect. Therefore, the cellular profiles of immune responses in these organs were evaluated. To do this, mice were infected and treated as described in Sections 2.2 and 2.4 of the Materials and Methods, and sacrificed at 5 dpi; the brain and lungs were harvested, processed, and the recovered cells stained with specific antibodies for further flow cytometry analysis.

The results showed that the number of myeloid cells (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup>) and microglia (CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>mid-low</sup>) in the brain decreased markedly with CQ treatment (Figure 4A). Notably, M220+CQ treatment was more effective than CQ, reducing both cell subsets in the brain (Figure 4A). Treatment with M220+CQ increased IL-10 production more than TNF production in both cell lines, compared to the group treated with CQ alone, which presented higher levels of TNF than IL-10 (Figure 4B). A decrease in the number of macrophages, DCs, neutrophils, and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes that produce TNF (Figure 4C) and IL-10 (Figure 4D) was found in the CQ and M220+CQ groups. The efficiency of M220+CQ to induce higher levels of IL-10 than TNF, an essential player in immunoregulation, was also observed in these leukocytes (Figure 4E). Furthermore, untreated mice infected with PbA showed robust Th1 and Th17 responses (Figure 4F), producing IFN-γ and IL-17A (Figure 4G), respectively, with lower and less activated Th2 and regulatory T cells (Tregs) (Figure 4F),

producing IL-10 (Figure 4G). Moreover, a higher number of CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>IL-17A<sup>+</sup> T lymphocytes was observed in the untreated infected group (Figure 4H). In contrast, PbA-infected mice treated with M220+CQ exhibited decreasing Th1 and Th17 responses (Figure 4F), followed by significantly decreased levels of IFN- $\gamma$  and IL-17A, and an increase in IL-10 (Figure 4G), compared to the untreated infected group. This pattern was observed when the CD8<sup>+</sup> T cells of the M220+CQ group were compared with those of the untreated infected group (Figure 4H,I).



**Figure 3.** M220 improves lung mechanical capacity during PbA infection. C57Bl/6 mice were infected with PbA and treated as described in Figure 2. (A) Representative photomicrographs of H&E-stained lung sections (4× and 40×). Sections from an uninfected mouse with normal histological appearance (Co) and a PbA-infected mouse (If) showing thickening of the alveolar septa (arrow) at 6 dpi. Notably, treatment with M220+CQ reduced the lung injury observed at 6 dpi. The bars in the image represent 50  $\mu$ m. (B) Histological score of lung tissue. (C) Descriptive analysis of 6 dpi histopathological parameters 6 dpi. Notably, treatment with M220+CQ reduced the lung injury observed at 6 dpi. The

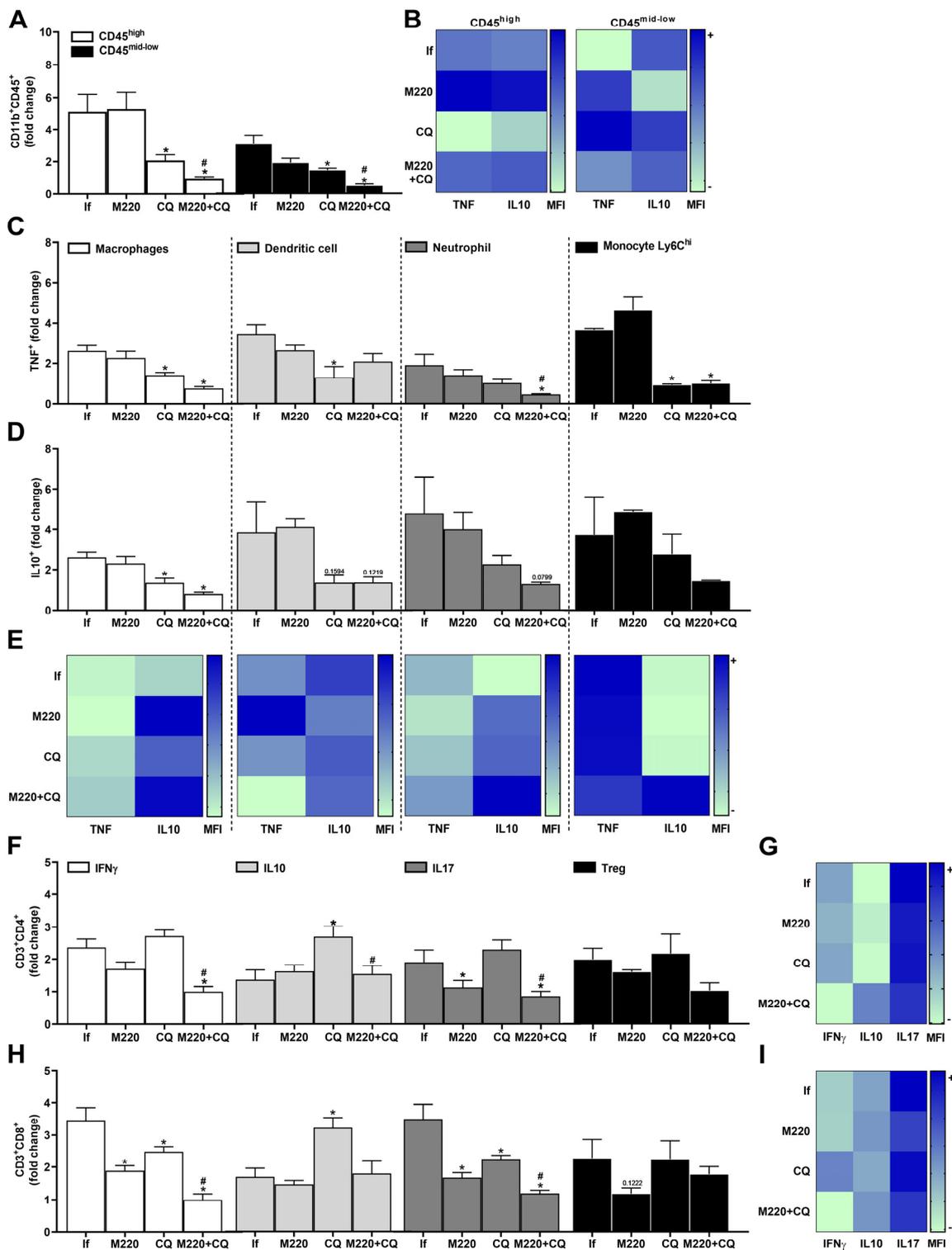
bars in the image represent 50  $\mu\text{m}$ . (B) Histological score of lung tissue. (C) Descriptive analysis of 6 dpi histopathological parameters. At 5 and 6 dpi, mice were anesthetized, tracheostomized, placed in a body plethysmograph, and connected to a computer-controlled ventilator. The following parameters have been evaluated: (D) chord compliance (C<sub>chord</sub>), (E) dynamic compliance (C<sub>dyn</sub>), (F) maximum compliance (C<sub>pk</sub>), (G) forced expiratory volume at 20 ms (FEV<sub>20</sub>), (H) forced vital capacity (FVC), (I) inspiratory capacity (IC), (J) lung resistance (R<sub>l</sub>), and (K) tidal volume (TV). Data are representative of at least two independent experiments (4–6 mice/group) and are shown as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA variance with Tukey's post hoc test and Student's *t*-test. # for comparison of control groups vs. infected group; \* for comparison of the CQ group vs. M220+CQ group. \* or # *p* < 0.05.

### 2.5. Effects of M220 on PbA-Induced Inflammatory Response in the Lungs

PbA infection induced a marked increase in the number of cytokine-releasing cells in the lung: three-fold for TNF- and DC-producing macrophages, and five-to-seven-fold for TNF-producing neutrophils and alveolar macrophages (Figure 5A). Furthermore, although in lower quantities than TNF<sup>+</sup> cells, a greater number of IL-10-producing macrophages, DCs, neutrophils, and alveolar macrophages were found in the lungs after PbA infection (Figure 5B). Although CQ treatment increased the number of TNF-producing macrophages (Figure 5A), it reduced the levels of TNF and increased the levels of IL-10 production by these cells during infection (Figure 5C). Treatment with the M220+CQ increased the number of TNF<sup>+</sup> DCs and neutrophils (Figure 5A) but reduced the levels of TNF production by alveolar macrophages (Figure 5C). Notably, this treatment induced a greater number of macrophages, DCs, neutrophils, and alveolar macrophages positive for IL-10 (Figure 5B). In addition, treatment with the M220+CQ stimulated these cells, except alveolar macrophages, to produce higher levels of this anti-inflammatory cytokine, in comparison with infected untreated mice (Figure 5C). The results also demonstrated that M220+CQ affected the profile of Th cells during infection by increasing IL-10- and IL-17A-positive cells and Treg lymphocytes (Figure 5D). Moreover, M220+CQ treatment resulted in higher levels of IL-10 production than IFN- $\gamma$  and IL-17A production by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes (Figure 5E,G). Notably, M220 treatment potentiated IL-10 production by Treg CD8<sup>+</sup> cells (Figure 5G). These data corroborate the potential for M220 to act as an anti-inflammatory agent during severe malaria progression.

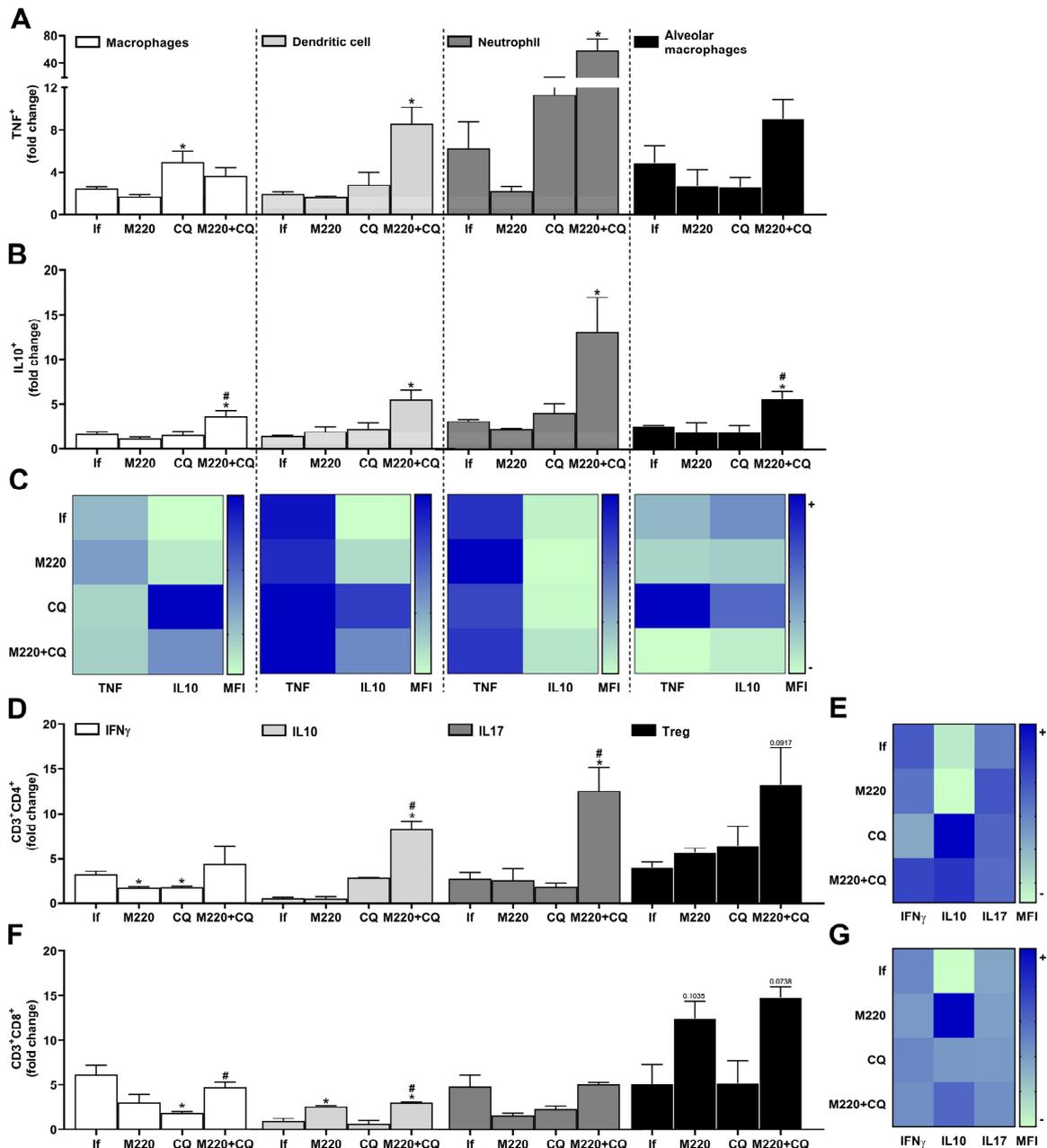
### 2.6. Effects of M220 on Innate and Adaptive Immune Cell Populations in the Spleen of PbA-Infected Mice

The spleen contains several immune and stromal cells, providing an environment for tracking the blood in search of foreign molecules and organisms, and activating immune cells [34]. During PbA infection, infected red blood cells circulate through the body, the spleen being an essential organ for the activation and/or generation/expansion of immune cells against this infection. Treatment with M220+CQ reduced the number of TNF<sup>+</sup> and IL-10<sup>+</sup> macrophages, DCs, neutrophils, and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (Figure 6A,B) compared to the infected untreated group. Notably, treatment with M220+CQ affected the stability of TNF and IL-10 cytokine production by reducing TNF and augmenting IL-10 levels by these cell subsets, except for neutrophils (Figure 6C). Moreover, M220+CQ-treated mice suffered a profound reduction in Th1, Th2, Th17, and Treg lymphocytes (Figure 6D), and also reduction in CD8<sup>+</sup> T cells producing IFN- $\gamma$ , IL-10, or IL-17A, and CD8<sup>+</sup> Treg lymphocytes (Figure 6F). In the spleen, treatment with M220+CQ, but not CQ alone, reduced the production of IFN- $\gamma$  and IL-10 by CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes when compared with infected untreated mice (Figure 6E,G).



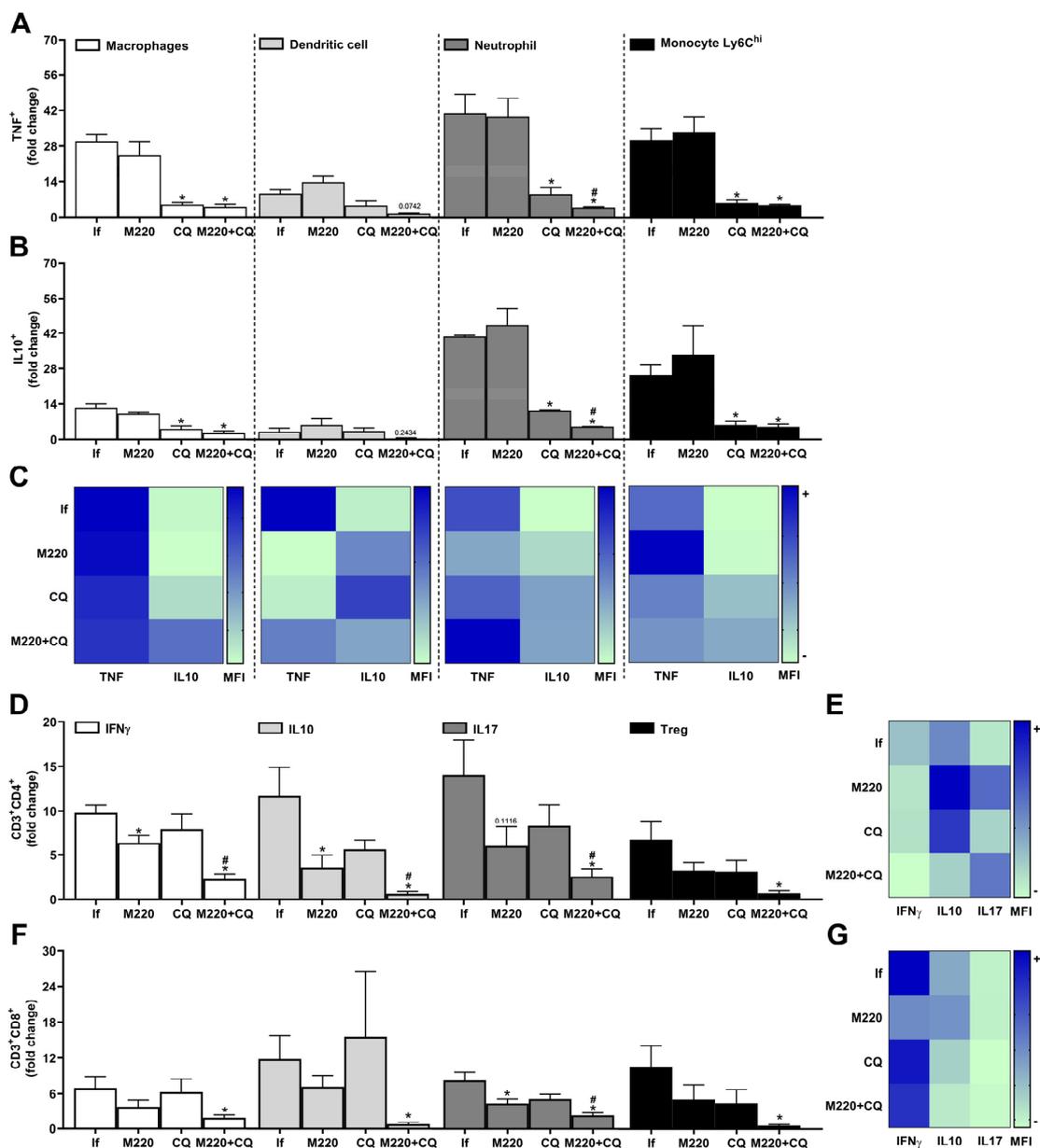
**Figure 4.** Effects of M220 on brain inflammation during PbA infection in mice. C57Bl/6 mice were infected with PbA and treated as described in Figure 2. Mice were sacrificed at 5 dpi, their brains were harvested and homogenized, and resident and sequestered cell populations were analyzed by flow cytometry. (A) CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>hi</sup> and CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>mid-low</sup> cells. (B) Heat map row representing mean fluorescence intensity (MFI) of TNF and IL-10 in CD11b<sup>+</sup>CD45<sup>mid-low</sup>; (C) and (D) CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells (macrophages), CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> (DCs), CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (neutrophils), and Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (Ly6C<sup>hi</sup> monocytes) positive for TNF (C) and IL-10 (D). (E) Heat map representing the MFI of TNF and IL-10 in macrophages, DCs, neutrophils, and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes. (F) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes were positive

for IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, and Foxp3 (Treg). (G) Heat maps representing MFI of IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-17A in CD4<sup>+</sup> lymphocytes. (H) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes positive for IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, and Foxp3 (Treg). (I) Heat map representing MFI of IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-17A in CD8<sup>+</sup> lymphocytes. In all heat maps, the color scale corresponds to relative MFI levels for each cytokine analyzed (data are presented in grayscale; black indicates the highest cytokine MFI levels, and white indicates the lowest cytokine MFI levels). Data presented in the graphs represent normalized cell number changes in uninfected control mice. Data are representative of two independent experiments (6 mice/group) and are shown as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed using one-way ANOVA with Tukey's post hoc test, two-way ANOVA with Sidak's post-test, and Student's *t*-test. # to compare the CQ group with the M220+CQ group; \* for comparison of infected treated groups vs. infected untreated group. \* or # *p* < 0.05.



**Figure 5.** Effects of M220 on PbA-induced inflammatory response in the lung. C57Bl/6 mice were infected with PbA and treated as described in Figure 1. Mice were sacrificed at 5 dpi, lungs were harvested and homogenized, and resident and sequestered cell populations were analyzed by flow cytometry. (A) and (B) CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> (macrophages), CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> (DCs), CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup>

(neutrophils), and SinglecF<sup>+</sup>CD11c<sup>+</sup> (alveolar macrophages) cells were positive for TNF (A) and IL-10 (B). (C) Heat map representing the median fluorescence intensity (MFI) of TNF and IL-10 in macrophages, DCs, neutrophils, and alveolar macrophages. (D) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes were positive for IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, and Foxp3 (Treg). (E) Heat map representing the MFI of IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-17A in CD4<sup>+</sup> T cells. (F) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes were positive for IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, and Foxp3 (Treg). (G) Heat map representing the MFI of IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-17A in CD8<sup>+</sup> T cells. In all heat maps, the color scale corresponds to relative levels of the MFI for each cytokine analyzed (data are presented in grayscale; black indicates the highest cytokine MFI levels, and white indicates the lowest cytokine MFI levels). The data presented in the graphs represent fold-changes in cell numbers normalized to uninfected control mice. Data are representative of at least two independent experiments (three mice/group) and shown as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA variance with Tukey's post hoc test and Student's *t*-test. # for comparison of CQ group vs. M220+CQ group; \* for comparison of infected treated groups vs. infected untreated group. \* or # *p* < 0.05.



**Figure 6.** Effects of M220 on innate and adaptive cells profile in the spleen of PbA-infected mice. C57Bl/6 mice were infected with PbA and treated as outlined in the legend of Figure 2. Mice were

sacrificed at 5 dpi, spleens were harvested and homogenized, and splenocytes were analyzed by flow cytometry. (A) and (B) CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> cells (macrophages), CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>-</sup> (DCs), CD11b<sup>+</sup>Ly6G<sup>+</sup> (neutrophils), and Ly6G<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (Ly6C<sup>h</sup> monocytes) were positive for TNF (A) and IL-10 (B). (C) Heat map depicting the mean fluorescence intensity (MFI) of TNF and IL-10 in macrophages, DCs, neutrophils, and Ly6C<sup>h</sup> monocytes. (D) CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> lymphocytes were positive for IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, and Foxp3 (Treg). (E) Heat map representing the MFI of IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-17A in CD4<sup>+</sup> T cells. (F) CD3<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> lymphocytes were positive for IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-17A, and Foxp3 (Treg). (G) Heat map representing the MFI of IFN- $\gamma$ , IL-10, and IL-17A in CD8<sup>+</sup> T cells. In all heat maps, the color scale corresponds to the relative levels of MFI for each cytokine analyzed (data are presented in grayscale; black indicates the highest cytokine MFI levels, and white indicates the lowest cytokine MFI levels). Data presented in the graphs represent normalized cell number changes in uninfected control mice. Data are representative of two independent experiments (six mice/group) and are shown as the mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using one-way variance ANOVA with Tukey's post hoc test and Student's *t*-test. # to compare the CQ group with the M220+CQ group; \* for comparison of infected treated groups vs. infected untreated group. \* or #  $p < 0.05$ .

### 3. Discussion

Severe malaria has a high mortality rate. This disease produces intense inflammation, causing several health complications [35]. In addition to death, the main challenge for malaria infection is the side effects of antimalarial drugs, which can cause symptoms to persist or even worsen after treatment [36,37]. The treatment proposed here with compound M220 prolonged the survival of mice four-fold. The combination of M220 and CQ increased survival more than six-fold, compared to untreated infected mice. M220+CQ guarantees approximately 60% of mice survival, which is much higher than the results obtained with CQ alone.

Clinical signs of weakness, pain, and apparent exhaustion have been described in human malaria [38]. PbA infection provides some of these clinical signs that mimic the clinical condition [39,40]. Importantly, treatment with M220 significantly improved discomfort and clinical score, suggesting that this has promise in alleviating suffering caused by infection. Human malaria also causes nausea and loss of appetite, often making it difficult for patients to eat properly, leading to weight loss [41]. When comparing treatments, M220+CQ, but not CQ alone, prevented weight loss at all time points, suggesting that these mice maintained their appetite and food intake at an average level. Once again, M220 avoids some of the drawbacks of using CQ.

Severe malaria can be fatal if not treated quickly [4], and even with effective treatments, it can cause serious harm to affected humans [17,20]. The severe malaria model used in this study can lead to the development of cerebral malaria in mice, allowing better exploration of ways to address the potential adverse effects caused by current therapies and the sequelae that cannot be avoided, such as loss of cognitive ability [39]. CQ controls parasite growth, but has specific side effects [17], and does not avoid the central nervous system (CNS) harm effects [17,42]. The data presented here confirm the literature [17,43], showing that the PbA infection process leads to loss of the ability to form memories. This ability was lost in CQ-treated mice. Notably, treatments with M220 alone or M220+CQ preserved the mice's ability to form memories, similar to those obtained in uninfected mice. This neuroprotection turned out to be permanent, considering that the treatment was interrupted after 12 dpi, and the mice retained their ability to form memories at least until 47 dpi, the last time point evaluated. This indicates that M220 is acting efficiently in the mice brain, presenting a substantial and persistent neuroprotective effect.

The balance between pro- and anti-inflammatory responses determines the outcome of infection [41]. Microglial cells are found in the CNS parenchyma and share several characteristics with macrophages [44]. After neuronal or tissue damage, microglial cells change their shape and immunocytochemical phenotype to transition to the activated state [43,45]. Microglial function is important against infectious agents by participating in the initial immune response and the recruitment of peripheral cells of the immune system,

such as neutrophils, monocytes, and T lymphocytes, to the site of infection [44,46]. The number of microglia and migrating cells increased in PbA-infected brain tissue. In addition, treatment with M220+CQ decreased the number of microglia and migrating cells, reaching levels similar to those found in the brains of uninfected mice.

Pro-inflammatory responses, including the production of TNF and IFN- $\gamma$ , are essential for protection against pathogens by presenting an antiparasitic effect [47]. However, the association of TNF and IFN- $\gamma$  with other pro-inflammatory cytokines is known to cause severe malaria [6,47]. Treatment with M220+CQ significantly decreased the number of macrophages, DCs, neutrophils, and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes producing TNF in the brain during PbA infection. This treatment also reduced the number of TNF-positive Ly6C<sup>hi</sup> monocytes and levels of these cytokines produced by them in the brain. Ly6C<sup>hi</sup> monocytes are an extremely important cellular subtype associated with the severity of cerebral malaria [48]. When they accumulate in the brain, they can be lethal and/or aggravate neurological manifestations [49,50].

In addition to TNF, the cytokines IFN- $\gamma$  and IL-17A have also been associated with an increased risk of developing cerebral malaria [51]. Although IFN- $\gamma$  can induce protective immune responses against parasitemia, reinfection, and anemia [52], its reduction or absence significantly decreases malaria pathogenesis [12,53]. Treatment with M220+CQ reduced the number of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells positive for IFN- $\gamma$  and IL-17A and decreased the production of these cytokines. As IFN- $\gamma$  is also associated with worse cognitive tasks involving the hippocampus, and the absence of IFN- $\gamma$  leads to better cognitive performance [54], a mechanism by which treatment with M220 protects memory is modulation of the production of key cytokines involved in malaria pathogenesis. Another important finding that may be associated with the described protection was the increase in the number of IL-10-positive CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. It is well-known that IL-10 plays a regulatory role in the development of pathogenesis associated with severe malaria, inducing an anti-inflammatory environment [16]. Importantly, the M220+CQ treatment also increased the levels of IL-10 production by macrophages, neutrophils, and microglia in the brain during PbA infection. Therefore, M220+CQ treatment decreased the number of resident and recruited cells of innate and adaptive immune responses, producing pro-inflammatory cytokines and promoting a less inflammatory environment in the brain.

Severe malaria may also affect the lung [3,55,56], inducing malaria-associated acute respiratory distress syndrome, a complication caused by the disease despite treatment with antimalarial drugs [3,12]. In the current study, PbA-infected untreated mice had impaired lung capacity. Treatment with M220+CQ demonstrated better effects in maintaining lung function than the other groups. These findings demonstrate an additional effect of compound M220 in treating severe malaria and protecting lung capacity/function in addition to CNS/cognitive activity. Lung protection may be related to increased numbers of resident (alveolar macrophages) and migrated (macrophages, DCs, and neutrophils) IL-10-positive cells, as well as increased levels of IL-10 production by these cells.

Alveolar macrophages are the main source of IL-10 in healthy lungs and are constitutively secreted under normal conditions [56]. Studies in mice have identified an anti-inflammatory role for IL-10 as a preventive agent against potential tissue damage due to the inflammation [16,56]. These findings corroborate our hypothesis that increased IL-10 production is the explanation for why the lungs of mice treated with M220 exhibit characteristics of non-fibrotic lungs. Furthermore, a significant reduction in IFN $\gamma$  was observed in the lung and, as has been mentioned for the brain, a favorable scenario is drawn to improve protection against the development of the pathogenesis of the disease. Additionally, another major benefit of M220 was the increased number of Tregs, both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, despite the increase in Th17. The increase in Th2 cells and Tregs can counteract the presence of Th17, thus protecting against lung injury. Notably, IL-17A may be detrimental to lung health in cases of acute lung injury [57,58], although this cytokine protects against various pathogens. For example, IL-17A-deficient mice are more susceptible to different respiratory pathogens, including fungi [59] and bacteria [60]. From our results, we

can infer that during malaria infection, Th17 cells do not show their harmful characteristics during treatment. Further research is needed to understand how it positively helps protect treated mice.

The spleen is a crucial organ for the clearance of parasitized red blood cells and the generation of immunity during malaria [61]. It is also the primary site where the adaptive immune response against the blood stage of *Plasmodium* infection is initiated [62]. A lower number of innate immune cells were found in the spleens of mice treated with CQ and M220+CQ. Effective CQ-combating of the parasite at the blood stage [19] may contribute to reducing the generation/differentiation of macrophages, DCs, neutrophils, and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes and their migration into the spleen. However, treatment with M220+CQ, but not CQ alone, decreased the number of all lymphocyte subsets tested, compared to that of untreated infected mice. Notably, the reduced cells that still migrated and/or were generated in the spleen maintained a prevalent anti-inflammatory environment, producing lower TNF and higher IL-10 levels (macrophages, DCs, and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes) and lower IFN- $\gamma$  levels (CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> lymphocytes), compared to untreated infected mice.

The chemokine milieu induced during M220+CQ treatment may also have contributed to CNS and lung protection, reducing migration and/or expansion of the inflammation. However, future analysis is necessary to confirm or investigate this hypothesis, mainly by evaluating the production levels of CCL2, CCL4, CXCL4, CXCL8, CXCL10, and the receptors CXCR3 and CCR2, correlated with susceptibility to cerebral malaria and lung inflammation [9–11]. As future perspectives, our research group aims to investigate the effects of the compound M220 (i) when combined with other antimalarial drugs commonly prescribed in clinic settings; and (ii) on various parasite strains, particularly those that have shown resistance to different antimalarial drugs. Furthermore, M220 may be a promising candidate to be studied against different pathologies in which infectious and inflammatory processes are involved.

## 4. Materials and Methods

### 4.1. Synthesis of *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220)

*General remarks.* Starting materials and reagents were obtained from commercial suppliers (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) and were used without further purification. Melting points (Mp) are uncorrected and were determined with a Reichert Kofler thermopan or in capillary tubes in a Büchi 510 apparatus. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz) and <sup>13</sup>C NMR and DEPT (75.4 MHz) spectra were recorded with a Bruker AMX spectrometer using CDCl<sub>3</sub> as solvent. Chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts-per-million (ppm) using TMS as an internal standard. Coupling constants *J* are expressed in Hertz (Hz). Spin multiplicities are given as s (singlet), d (doublet), and m (multiplet). Mass spectrometry was carried out with a Hewlett-Packard 5988A spectrometer. Flash chromatography (FC) was performed on silica gel (Merck 60, 230–400 mesh); analytical TLC was performed on precoated silica gel plates (Merck 60 F254). Organic solutions were dried over anhydrous sodium sulfate. Concentration and evaporation of the solvent after reaction or extraction was carried out on a rotary evaporator (Büchi Rotavapor) operating under reduced pressure. The analytical results document  $\geq 97\%$  purity for the final compound M220.

*Procedure for the preparation of the 3-aminocoumarin.* The commercially available 3-nitrocoumarin (1.0 mmol) was dissolved in ethanol (10 mL). Palladium on carbon (Pd/C, catalytic amount) was added, and the suspension stirred in hydrogen gas (H<sub>2</sub>) atmosphere for 5 h. The batch was evaporated and purified by flash chromatography, using hexane/ethyl acetate (9:1), to give the 3-aminocoumarin in 95% yield.

*Procedure for the preparation of the N-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220).* To a mixture of 3-aminocoumarin (1.0 mmol) and pyridine (1.1 mmol) in dichloromethane (5 mL), cinnamoyl chloride (1.1 mmol) was added dropwise at 0 °C, with constant stirring. The reaction mixture was stirred at 0 °C to room temperature overnight. The organic phase was then partitioned at first with saturated NaHCO<sub>3</sub>, and then with water. The organic portions were combined and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and filtered, and the solvent

was evaporated to give a crude product. It was then purified by flash chromatography, using hexane/ethyl acetate (9:1), to give *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220, 59%). M.p.: 215 °C. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm), *J* (Hz): 6.68 (d, 1H, *J* = 15.6, CH), 7.31–7.63 (m, 9H, ArH), 7.81 (d, 1H, *J* = 15.6, CH), 8.34 (s, 1H, NH), and 8.88 (s, 1H, ArH). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 116.6, 120.3, 122.5, 124.4, 125.5, 125.7, 128.6, 129.7, 130.4, 130.7, 135.4, 141.9, 150.4, 158.2, and 165.8. DEPT (CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 116.6, 122.5, 124.4, 125.7, 128.6, 129.7, 130.4, 130.7, and 141.9. EI-MS *m/z* (%): 291.

#### 4.2. Ethics Statement

C57Bl/6 female mice (aged 8–10 weeks) were obtained from the Central Animal Hospital (ICB—UFMG). The mice were maintained in microisolators containing food and water ad libitum, according to the Brazilian Guidelines on Animal Work and the Guide for the Care and Use of Laboratory Mice of the National Institutes of Health (NIH). This study was approved by the Animal Ethics Committee (CEUA) of the Universidade Federal de Minas Gerais (permit number: 345/2023).

#### 4.3. Infection

The mice were infected with the *Plasmodium berghei* ANKA (PbA) green fluorescent protein (GFP) clone cl15cy1 strain (which constitutively expresses GFP throughout the life cycle), donated by Prof. Cláudio Romero Farias Marinho (Departamento de Parasitologia, Universidade de São Paulo, USP). Mice were infected intraperitoneally (i.p.), with a standardized inoculum of  $1 \times 10^5$  parasitized red blood cells (pRBCs) per mouse in sterile phosphate buffer solution (PBS, 200 µL). Parasitemia was determined through analysis of GFP expression by flow cytometry, as previously described [6,37]. Briefly, a drop of tail whole blood was collected from mice infected or not with PbA. The blood was directly placed into a polystyrene tube containing 2 mL of sterile PBS for flow cytometry analysis using FACS Canto II (Becton Dickinson, San José, CA, USA). The GFP frequency was measured using a laser (488 nm), and the data were analyzed using FlowJo software (version 10). The erythrocyte population was identified on their morphological characteristics in dot plot graphic (FSCxSSC), and then was analyzed for the presence of GFP<sup>+</sup>. A total of 100,000 events were acquired for each sample. The mice were observed daily throughout the infection period for parasitemia, weight loss, and survival. The clinical signs of CM were assessed daily using a rapid murine coma and behavior scale [63].

#### 4.4. Treatments

The mice were infected as described above. After 3 days post-infection (dpi), when parasitemia became detectable in the bloodstream, they were treated orally by gavage with M220 (10 mg/kg dose administered for in vivo treatments in mice, and similarly a safe dose of selective MAO-B inhibitors [28], without any observed toxic effects) and/or CQ (30 mg/kg) once daily for 10 days, diluted in 0.5% carboxymethyl cellulose (vehicle).

#### 4.5. Novel Object Recognition Test

The test was conducted in an open field measuring 40 × 60 cm, delimited by four walls 50 cm in height [6]. On the first day (3 dpi), habituation was performed. The animal was carefully placed in the rear left corner of the device, and the environment was explored for 5 min. On the second day (4 dpi), the animal was returned to the device, in which there were two objects of the same shape, size, and color (A1 and A2) for an exploration time of 10 min. The next day (24 h later) (5 dpi), long-term memory and response to the placement of a new object (B), in an exploration time of 5 min, were evaluated. Notably, representatives of the control and M220+CQ-treated infected groups still alive after 45 dpi were subjected again to the new object recognition test. Briefly, exploratory preference was

defined as the percentage of total exploration time spent investigating a familiar object (A) or new object (B), calculated for each animal:

$$TB/(TA + TB) \times 100$$

where TA = time spent exploring familiar object A and TB = time spent exploring new object B. The distance covered in the arena of the apparatus was recorded as a parameter of locomotor activity. Anymaze software (<https://www.any-maze.com>) (Stoelting Co., Wood Dale, IL, USA) was used for the behavioral analysis.

#### 4.6. Spirometry

Mice were infected with  $1 \times 10^5$  pRBCs, treated or not with M220 and/or CQ, anesthetized with an association of xylazine (12.5 mg/kg, Syntec do Brasil Ltd.a, Barueri, Brazil) and ketamine (100 mg/kg, Syntec do Brasil Ltd.a) subcutaneously, and subjected to invasive spirometry (Buxco Research Systems, Wilmington, NC, USA) [64]. Under mechanical respiration, the tidal volume (TV), dynamic compliance (C<sub>dyn</sub>), and lung resistance (RI) were determined using resistance and compliance (RC) tests. To measure chord compliance (C<sub>chord</sub>) and peak of compliance (C<sub>pk</sub>), the lungs were inflated to a standard pressure of +30 cm H<sub>2</sub>O and then slowly exhaled until a negative pressure of −30 cm H<sub>2</sub>O was reached. C<sub>chord</sub> was evaluated at +10 cm H<sub>2</sub>O and C<sub>pk</sub> was determined by the pressure/volume ratio at the peak. Forced vital capacity (FVC) and inspiratory capacity (IC) were recorded during this maneuver. The fast-flow volume maneuver was performed, and the lungs were first inflated to +30 cm H<sub>2</sub>O and immediately subjected to a highly negative pressure to enforce expiration until −30 cm H<sub>2</sub>O, and the forced expiratory volume at 20 ms (FEV<sub>20</sub>) was recorded.

#### 4.7. Immunophenotyping by Flow Cytometry

Mice infected with PbA were euthanized at 5 dpi. The brains and spleens were removed and processed according to the methodology described by Brant et al. [37]. Lungs were removed and processed according to the methodology described by Claser et al. [12]. Purified cells from the brain, lung, and spleen were plated and incubated with brefeldin A (10 µg/mL) (Invitrogen, Waltham, MA, USA) for 3 h at 37 °C in the presence of 5% CO<sub>2</sub>. The cells were blocked with Fc Block (antibody CD16/CD32 in PBS/BSA 1%), followed by staining with specific combinations of antibodies for cell surface molecule labeling: CD3 and CD11b (APC-Cy7); CD4 and Ly6C (PE-Cy7); CD8, Ly6G, and SinglecF (BV421); CD25 and CD45 (PerCP-Cy5.5); F4/80 (FITC); CD11c (V500); and isotype controls (all antibodies from BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA). For intracellular staining, the following antibodies were added: IFN-γ (Alexa 488), IL-17A, Foxp3 (PE), TNF (PE), and IL-10 (APC). A total of 30,000 cells (events) were acquired using a FACS Canto II cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (ver. 10). Our gating strategy is shown schematically in Supplementary Figure S1 (for innate immune cells subset composition) and Supplementary Figure S2 (for adaptive immune cells subset composition).

#### 4.8. Histopathological and Morphometric Analysis

After mechanical procedures and bronchoalveolar lavage, mice were euthanized. The lungs and brain were removed and immediately fixed in 4% buffered formalin for 72 h. Then, the samples were gradually dehydrated in ethanol, diaphanized in xylol, and embedded in paraffin. Next, 5 µm thick sections were cut with which histopathological slides were prepared and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histopathological, semi-quantitative, and morphometric analyses. All histopathological analyses were performed blindly. The lungs were analyzed to assess inflammation in the airway and perivascular and parenchymal regions. The score was based on a previously described method [65]. For histopathological analysis, the brain fragments were analyzed for the presence of congestion, hemorrhage areas, and cellular infiltration. The morphometric analysis was performed by adapting the methodology previously described [66]. To quantify the inflammatory

infiltrate, 20 randomized images of the cerebral cortex at 40× magnification were digitized, and the infiltrate was identified and manually quantified using a cursor.

#### 4.9. Statistical Analysis

Statistical significance was assessed using GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Student's *t*-test, one-way analysis of variance (ANOVA), Tukey's multiple comparisons post-test, two-way ANOVA, and Sidak's multiple comparisons post-test were used as described in each figure legend. Data are represented as mean ± SEM, with significance set at  $p \leq 0.05$ . Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software).

## 5. Conclusions

After a preliminary screening of a series of coumarins with neuroprotective properties, *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220) has been synthesized and explored for its *in vivo* activity against severe malaria. After analyzing the first PbA model results, showing impressive cognitive insights, a study on the anti-inflammatory and neuroprotective properties, based on an extensive immunological profile, has been performed. Overall, the present study suggests that compound M220, mainly combined with CQ, exerts immunomodulatory, neuroprotective, and pulmonary function-preserving effects. The treatment proved to be effective on both organs mainly affected by severe malaria: brain and lungs. Moreover, M220 proved to be ideal for oral administration in the mice model, making it a very interesting therapeutic option for the treatment of this severe disease.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/ph17010046/s1>, Figure S1: (A) Synthetic methodology and reaction conditions for obtaining *N*-(coumarin-3-yl)cinnamamide (M220). The synthesis was performed in two steps, as described previously. (B) Proton nuclear magnetic resonance (<sup>1</sup>H NMR) spectrum. <sup>1</sup>H NMR spectroscopy was used to determine the chemical structure. The presence of a broad singlet at 8.34 ppm was compatible with the nitrogen proton of the amide group. In addition, the presence of a duplet at 6.68 ppm, with a coupling constant of 15.6 Hz, is compatible with the hydrogen of the double bond contiguous to the carbonyl group of the amide (a *trans* isomer). (C) Carbon nuclear magnetic resonance (<sup>13</sup>C NMR) spectrum, with the DEPT spectrum in the black box. (D) Electron ionization (EI) mass spectrum. (E) High performance liquid chromatography (HPLC) trace and purity index; Figure S2: A schematic representation of gating strategy for innate immune subpopulations isolated from spleen, lung and brain of mice and stained for IL-10 and TNF cytokine production, and corresponding dotplots of IL-10<sup>+</sup> macrophages (and/or alveolar macrophages and/or microglia), neutrophils, dendritic, and TNF<sup>+</sup> macrophages (and/or alveolar macrophages and/or microglia), neutrophils and dendritic cells; Figure S3: A schematic representation of gating strategy for adaptative immune cells subpopulations isolated from spleen, lung and brain of mice and stained for IL-10, IFN- $\gamma$  and IL-17 cytokine production, and corresponding dotplots of: IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, IL-17<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells; IL-10<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells, IL-17<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T cells; and IL-10<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>Treg cells and IL-10<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>Treg cells.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.G., M.J.M. and F.S.M.; methodology, P.G., R.C.R., F.M.S.O., M.J.M. and F.S.M.; formal analysis, P.G., A.C., N.F.d.M.O., R.A.N.R., S.P., L.K., R.C.R. and F.M.S.O.; investigation, P.G., A.C., R.d.D.P., R.A.N.R., S.P., N.F.d.M.O., C.L.N.B., F.M.S.O., L.L.d.O.S., R.C.R. and M.J.M.; resources, M.J.M., M.M.T. and F.S.M.; data curation, P.G., R.C.R., R.d.D.P. and S.P.; writing—original draft preparation, P.G., A.C., N.F.d.M.O., S.P., L.K., R.A.N.R., R.d.D.P., L.L.d.O.S., F.M.S.O., M.M.T., M.J.M. and F.S.M.; supervision, M.J.M. and F.S.M.; project administration, M.J.M. and F.S.M.; funding acquisition, M.J.M., M.M.T. and F.S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq: 307828/2022-0 for FSM), Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG: APQ-02331-18, APQ-01816-23; Rede Mineira de Imunobiológicos: RED-00140-16 and RED-00067-23; and Rede de Investigação em Mucosas e Pele: RED-00096-22), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES-Brazil), National Institute for Science and

Technology in Dengue and Host-microbial Interactions (APQ-03606-17), and the Ministerio de Ciencia e Innovación (PID2020-116076RJ-I00/AEI/10.13039/501100011033).

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Institutional Review Board (or Ethics Committee) of Ethics Committee for Animal Experimentation of the UFMG (Approval no 345/2023).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data will be made available on request.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Jacqueline Barbosa de Oliveira Viana, Frankcineia Aparecida de Assis, and Domenico Romano Romani for their technical assistance.

**Conflicts of Interest:** The authors declare that they have no conflicts of interest.

## References

- Phillips, M.A.; Burrows, J.N.; Manyando, C.; van Huijsduijnen, R.H.; Van Voorhis, W.C.; Wells, T.N.C. Malaria. *Nat. Rev. Dis. Primers* **2017**, *3*, 17050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Wassmer, S.C.; Grau, G.E.R. Severe Malaria: What's New on the Pathogenesis Front? *Int. J. Parasitol.* **2017**, *47*, 145–152. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vandermosten, L.; Pham, T.-T.; Possemiers, H.; Knoops, S.; Van Herck, E.; Deckers, J.; Franke-Fayard, B.; Lamb, T.J.; Janse, C.J.; Opdenakker, G.; et al. Experimental Malaria-Associated Acute Respiratory Distress Syndrome Is Dependent on the Parasite-Host Combination and Coincides with Normocyte Invasion. *Malar. J.* **2018**, *17*, 102. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- World Health Organization. In *World Malaria Report*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022.
- Craig, A.G.; Grau, G.E.; Janse, C.; Kazura, J.W.; Milner, D.; Barnwell, J.W.; Turner, G.; Langhorne, J. The Role of Animal Models for Research on Severe Malaria. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*, e1002401. [[CrossRef](#)]
- Brant, F.; Miranda, A.S.; Esper, L.; Gualdrón-López, M.; Cisalpino, D.; de Souza, D.d.G.; Rachid, M.A.; Tanowitz, H.B.; Teixeira, M.M.; Teixeira, A.L.; et al. Suppressor of Cytokine Signaling 2 Modulates the Immune Response Profile and Development of Experimental Cerebral Malaria. *Brain Behav. Immun.* **2016**, *54*, 73–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Deroost, K.; Pham, T.-T.; Opdenakker, G.; Van den Steen, P.E. The Immunological Balance between Host and Parasite in Malaria. *FEMS Microbiol. Rev.* **2016**, *40*, 208–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gowda, D.C.; Wu, X. Parasite Recognition and Signaling Mechanisms in Innate Immune Responses to Malaria. *Front. Immunol.* **2018**, *9*, 3006. [[CrossRef](#)]
- Van den Steen, P.E.; Deroost, K.; Aelst, I.V.; Geurts, N.; Martens, E.; Struyf, S.; Nie, C.Q.; Hansen, D.S.; Matthys, P.; Damme, J.V.; et al. CXCR3 Determines Strain Susceptibility to Murine Cerebral Malaria by Mediating T Lymphocyte Migration toward IFN- $\gamma$ -Induced Chemokines. *Eur. J. Immunol.* **2008**, *38*, 1082–1095. [[CrossRef](#)]
- Dunst, J.; Kamena, F.; Matuschewski, K. Cytokines and Chemokines in Cerebral Malaria Pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 324. [[CrossRef](#)]
- Lagassé, H.A.D.; Anidi, I.U.; Craig, J.M.; Limjunyawong, N.; Poupore, A.K.; Mitzner, W.; Scott, A.L. Recruited Monocytes Modulate Malaria-Induced Lung Injury through CD36-Mediated Clearance of Sequestered Infected Erythrocytes. *J. Leukoc. Biol.* **2016**, *99*, 659–671. [[CrossRef](#)]
- Claser, C.; Nguee, S.Y.T.; Balachander, A.; Wu Howland, S.; Becht, E.; Gunasegaran, B.; Hartimath, S.V.; Lee, A.W.Q.; Theng Theng Ho, J.; Bing Ong, C.; et al. Lung Endothelial Cell Antigen Cross-Presentation to CD8+T Cells Drives Malaria-Associated Lung Injury. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4241. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Götz, A.; Tang, M.S.; Ty, M.C.; Arama, C.; Ongoiba, A.; Doumtable, D.; Traore, B.; Crompton, P.D.; Loke, P.; Rodriguez, A. Atypical Activation of Dendritic Cells by *Plasmodium Falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, E10568–E10577. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Hirako, I.C.; Ataide, M.A.; Faustino, L.; Assis, P.A.; Sorensen, E.W.; Ueta, H.; Araújo, N.M.; Menezes, G.B.; Luster, A.D.; Gazzinelli, R.T. Splenic Differentiation and Emergence of CCR5+CXCL9+CXCL10+ Monocyte-Derived Dendritic Cells in the Brain during Cerebral Malaria. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 13277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Freitas do Rosario, A.P.; Langhorne, J. T Cell-Derived IL-10 and Its Impact on the Regulation of Host Responses during Malaria. *Int. J. Parasitol.* **2012**, *42*, 549–555. [[CrossRef](#)]
- Nakamae, S.; Kimura, D.; Miyakoda, M.; Sukhbaatar, O.; Inoue, S.-I.; Yui, K. Role of IL-10 in Inhibiting Protective Immune Responses against Infection with Heterologous Plasmodium Parasites. *Parasitol. Int.* **2019**, *70*, 5–15. [[CrossRef](#)]
- Braga, C.B.E.; Martins, A.C.; Cayotopa, A.D.E.; Klein, W.W.; Schlosser, A.R.; da Silva, A.F.; de Souza, M.N.; Andrade, B.W.B.; Filgueira-Júnior, J.A.; de Pinto, W.J.; et al. Side Effects of Chloroquine and Primaquine and Symptom Reduction in Malaria Endemic Area (Mâncio Lima, Acre, Brazil). *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* **2015**, *2015*, 346853. [[CrossRef](#)]
- Mekonnen, D.A.; Abadura, G.S.; Behaksra, S.W.; Taffese, H.S.; Bayissa, G.A.; Bulto, M.G.; Tessema, T.S.; Tadesse, F.G.; Gadisa, E. Treatment of Uncomplicated Plasmodium Vivax with Chloroquine plus Radical Cure with Primaquine without G6PDd Testing Is Safe in Arba Minch, Ethiopia: Assessment of Clinical and Parasitological Response. *Malar. J.* **2023**, *22*, 135. [[CrossRef](#)]

19. Macedo, T.S.; Villarreal, W.; Couto, C.C.; Moreira, D.R.M.; Navarro, M.; Machado, M.; Prudêncio, M.; Batista, A.A.; Soares, M.B.P. Platinum(II)–Chloroquine Complexes Are Antimalarial Agents against Blood and Liver Stages by Impairing Mitochondrial Function. *Metallomics* **2017**, *9*, 1548–1561. [[CrossRef](#)]
20. Al-Bari, M.A.A. Chloroquine Analogues in Drug Discovery: New Directions of Uses, Mechanisms of Actions and Toxic Manifestations from Malaria to Multifarious Diseases. *J. Antimicrob. Chemother.* **2015**, *70*, 1608–1621. [[CrossRef](#)]
21. Soentjens, P.; Delanote, M.; Van Gompel, A. Mefloquine-Induced Pneumonitis. *J. Travel. Med.* **2006**, *13*, 172–174. [[CrossRef](#)]
22. Maguire, G.P.; Handoyo, T.; Pain, M.C.F.; Kenangalem, E.; Price, R.N.; Tjitra, E.; Anstey, N.M. Lung Injury in Uncomplicated and Severe Falciparum Malaria: A Longitudinal Study in Papua, Indonesia. *J. Infect. Dis.* **2005**, *192*, 1966–1974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Garg, S.S.; Gupta, J.; Sharma, S.; Sahu, D. An Insight into the Therapeutic Applications of Coumarin Compounds and Their Mechanisms of Action. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2020**, *152*, 105424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Stefanachi, A.; Leonetti, F.; Pisani, L.; Catto, M.; Carotti, A. Coumarin: A Natural, Privileged and Versatile Scaffold for Bioactive Compounds. *Molecules* **2018**, *23*, 250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Annunziata, F.; Pinna, C.; Dallavalle, S.; Tamborini, L.; Pinto, A. An Overview of Coumarin as a Versatile and Readily Accessible Scaffold with Broad-Ranging Biological Activities. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 4618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Matos, M.J.; Rodríguez-Enríquez, F.; Borges, F.; Santana, L.; Uriarte, E.; Estrada, M.; Rodríguez-Franco, M.I.; Laguna, R.; Viña, D. 3-Amidocoumarins as Potential Multifunctional Agents against Neurodegenerative Diseases. *ChemMedChem* **2015**, *10*, 2071–2079. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Sun, M.; Hu, J.; Song, X.; Wu, D.; Kong, L.; Sun, Y.; Wang, D.; Wang, Y.; Chen, N.; Liu, G. Coumarin Derivatives Protect against Ischemic Brain Injury in Rats. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *67*, 39–53. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Matos, M.J.; Vilar, S.; Gonzalez-Franco, R.M.; Uriarte, E.; Santana, L.; Friedman, C.; Tatonetti, N.P.; Viña, D.; Fontenla, J.A. Novel (Coumarin-3-Yl)Carbamates as Selective MAO-B Inhibitors: Synthesis, in Vitro and in Vivo Assays, Theoretical Evaluation of ADME Properties and Docking Study. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *63*, 151–161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Rodríguez-Enríquez, F.; Viña, D.; Uriarte, E.; Laguna, R.; Matos, M.J. 7-Amidocoumarins as Multitarget Agents against Neurodegenerative Diseases: Substitution Pattern Modulation. *ChemMedChem* **2021**, *16*, 179–186. [[CrossRef](#)]
30. Matos, M.J.; Novo, P.; Mayán, L.; Torres, I.; Uriarte, E.; Yáñez, M.; Fontenla, J.Á.; Ortuso, F.; Alcaro, S.; Procopio, F.; et al. 8-Amide and 8-Carbamate Substitution Patterns as Modulators of 7-Hydroxy-4-Methylcoumarin's Antidepressant Profile: Synthesis, Biological Evaluation and Docking Studies. *Eur. J. Med. Chem.* **2023**, *248*, 115091. [[CrossRef](#)]
31. Dwivedi, A.P.; Kumar, S.; Varshney, V.; Singh, A.B.; Srivastava, A.K.; Sahu, D.P. Synthesis and Antihyperglycemic Activity of Novel N-Acyl-2-Arylethylamines and N-Acyl-3-Coumarylamines. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **2008**, *18*, 2301–2305. [[CrossRef](#)]
32. Taylor, W.R.J.; Hanson, J.; Turner, G.D.H.; White, N.J.; Dondorp, A.M. Respiratory Manifestations of Malaria. *Chest* **2012**, *142*, 492–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Mohan, A.; Sharma, S.K.; Bollineni, S. Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome in Malaria. *J. Vector Borne Dis.* **2008**, *45*, 179–193. [[PubMed](#)]
34. Ghosh, D.; Stumhofer, J.S. The Spleen: “Epicenter” in Malaria Infection and Immunity. *J. Leukoc. Biol.* **2021**, *110*, 753–769. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Zekar, L.; Sharman, T. *Plasmodium Falciparum Malaria*; StatPearls Publishing: St. Petersburg, FL, USA, 2022.
36. Demissie, Y.; Ketema, T. Complicated Malaria Symptoms Associated with Plasmodium Vivax among Patients Visiting Health Facilities in Mendi Town, Northwest Ethiopia. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 436. [[CrossRef](#)]
37. Brant, F.; Miranda, A.S.; Esper, L.; Rodrigues, D.H.; Kangussu, L.M.; Bonaventura, D.; Soriani, F.M.; Pinho, V.; Souza, D.G.; Rachid, M.A.; et al. Role of the Aryl Hydrocarbon Receptor in the Immune Response Profile and Development of Pathology during Plasmodium Berghei Anka Infection. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 3127–3140. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Bartoloni, A.; Zammarchi, L. Clinical Aspects of Uncomplicated and Severe Malaria. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **2012**, *4*, e2012026. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Dai, M.; Reznik, S.E.; Spray, D.C.; Weiss, L.M.; Tanowitz, H.B.; Gulinello, M.; Desruisseaux, M.S. Persistent Cognitive and Motor Deficits after Successful Antimalarial Treatment in Murine Cerebral Malaria. *Microbes Infect.* **2010**, *12*, 1198–1207. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. WHO. *Guidelines for the Treatment of Malaria*, 3rd ed.; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2015; Available online: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/162441> (accessed on 8 December 2020) ISBN 978-92-4-154912-7.
41. Frimpong, A.; Amponsah, J.; Adjokatseh, A.S.; Agyemang, D.; Bentum-Ennin, L.; Ofori, E.A.; Kyei-Baafour, E.; Akyea-Mensah, K.; Adu, B.; Mensah, G.I.; et al. Asymptomatic Malaria Infection Is Maintained by a Balanced Pro- and Anti-Inflammatory Response. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 559255. [[CrossRef](#)]
42. Davis, S.N.; Wu, P.; Camci, E.D.; Simon, J.A.; Rubel, E.W.; Raible, D.W. Chloroquine Kills Hair Cells in Zebrafish Lateral Line and Murine Cochlear Cultures: Implications for Ototoxicity. *Hear. Res.* **2020**, *395*, 108019. [[CrossRef](#)]
43. Eyo, U.B.; Murugan, M.; Wu, L.-J. Microglia-Neuron Communication in Epilepsy: Microglia in Epilepsy. *Glia* **2017**, *65*, 5–18. [[CrossRef](#)]
44. Rock, R.B.; Gekker, G.; Hu, S.; Sheng, W.S.; Cheeran, M.; Lokensgard, J.R.; Peterson, P.K. Role of Microglia in Central Nervous System Infections. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17*, 942–964. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Figarella, K.; Wolburg, H.; Garaschuk, O.; Duzsenko, M. Microglia in Neuropathology Caused by Protozoan Parasites. *Biol. Rev.* **2020**, *95*, 333–349. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

46. Spanos, J.P.; Hsu, N.-J.; Jacobs, M. Microglia Are Crucial Regulators of Neuro-Immunity during Central Nervous System Tuberculosis. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *9*, 182. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Singh, N.; Sundar, S. Combined Neutralization of Interferon Gamma and Tumor Necrosis Factor Alpha Induces IL-4 Production but Has No Direct Additive Impact on Parasite Burden in Splenic Cultures of Human Visceral Leishmaniasis. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0199817. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Hirako, I.C.; Assis, P.A.; Galvão-Filho, B.; Luster, A.D.; Antonelli, L.R.; Gazzinelli, R.T. Monocyte-Derived Dendritic Cells in Malaria. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *52*, 139–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Swanson, P.A.; Hart, G.T.; Russo, M.V.; Nayak, D.; Yazew, T.; Peña, M.; Khan, S.M.; Janse, C.J.; Pierce, S.K.; McGavern, D.B. CD8+ T Cells Induce Fatal Brainstem Pathology during Cerebral Malaria via Luminal Antigen-Specific Engagement of Brain Vasculature. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1006022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Niewold, P.; Cohen, A.; van Vreden, C.; Getts, D.R.; Grau, G.E.; King, N.J.C. Experimental Severe Malaria Is Resolved by Targeting Newly-Identified Monocyte Subsets Using Immune-Modifying Particles Combined with Artesunate. *Commun. Biol.* **2018**, *1*, 227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Marquet, S.; Conte, I.; Poudiougou, B.; Argiro, L.; Cabantous, S.; Dessein, H.; Burté, F.; Oumar, A.A.; Brown, B.J.; Traore, A.; et al. The IL17F and IL17RA Genetic Variants Increase Risk of Cerebral Malaria in Two African Populations. *Infect. Immun.* **2016**, *84*, 590–597. [[CrossRef](#)]
52. Raballah, E.; Kempaiah, P.; Karim, Z.; Orinda, G.O.; Otieno, M.F.; Perkins, D.J.; Ong'echa, J.M. CD4 T-Cell Expression of IFN- $\gamma$  and IL-17 in Pediatric Malarial Anemia. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175864. [[CrossRef](#)]
53. Villegas-Mendez, A.; Greig, R.; Shaw, T.N.; de Souza, J.B.; Gwyer Findlay, E.; Stumhofer, J.S.; Hafalla, J.C.R.; Blount, D.G.; Hunter, C.A.; Riley, E.M.; et al. IFN- $\gamma$ -Producing CD4+ T Cells Promote Experimental Cerebral Malaria by Modulating CD8+ T Cell Accumulation within the Brain. *J. Immunol.* **2012**, *189*, 968–979. [[CrossRef](#)]
54. Monteiro, S.; Ferreira, F.M.; Pinto, V.; Roque, S.; Morais, M.; de Sá-Calçada, D.; Mota, C.; Correia-Neves, M.; Cerqueira, J.J. Absence of IFN $\gamma$  Promotes Hippocampal Plasticity and Enhances Cognitive Performance. *Transl. Psychiatry* **2016**, *6*, e707. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Aitken, E.H.; Negri, E.M.; Barboza, R.; Lima, M.R.; Álvarez, J.M.; Marinho, C.R.; Caldini, E.G.; Epiphanyo, S. Ultrastructure of the Lung in a Murine Model of Malaria-Associated Acute Lung Injury/Acute Respiratory Distress Syndrome. *Malar. J.* **2014**, *13*, 230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Steen, E.H.; Wang, X.; Balaji, S.; Butte, M.J.; Bollyky, P.L.; Keswani, S.G. The Role of the Anti-Inflammatory Cytokine Interleukin-10 in Tissue Fibrosis. *Adv. Wound Care* **2020**, *9*, 184–198. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Li, Q.; Gu, Y.; Tu, Q.; Wang, K.; Gu, X.; Ren, T. Blockade of Interleukin-17 Restrains the Development of Acute Lung Injury. *Scand. J. Immunol.* **2016**, *83*, 203–211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Yan, Z.; Xiaoyu, Z.; Zhixin, S.; Di, Q.; Xinyu, D.; Jing, X.; Jing, H.; Wang, D.; Xi, Z.; Chunrong, Z.; et al. Rapamycin Attenuates Acute Lung Injury Induced by LPS through Inhibition of Th17 Cell Proliferation in Mice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Murdock, B.J.; Huffnagle, G.B.; Olszewski, M.A.; Osterholzer, J.J. Interleukin-17A Enhances Host Defense against Cryptococcal Lung Infection through Effects Mediated by Leukocyte Recruitment, Activation, and Gamma Interferon Production. *Infect. Immun.* **2014**, *82*, 937–948. [[CrossRef](#)]
60. Murakami, T.; Hatano, S.; Yamada, H.; Iwakura, Y.; Yoshikai, Y. Two Types of Interleukin 17A-Producing  $\Gamma\delta$  T Cells in Protection Against Pulmonary Infection With *Klebsiella Pneumoniae*. *J. Infect. Dis.* **2016**, *214*, 1752–1761. [[CrossRef](#)]
61. Wang, H.; Li, S.; Cui, Z.; Qin, T.; Shi, H.; Ma, J.; Li, L.; Yu, G.; Jiang, T.; Li, C. Analysis of Spleen Histopathology, Splenocyte Composition and Haematological Parameters in Four Strains of Mice Infected with Plasmodium Berghei K173. *Malar. J.* **2021**, *20*, 249. [[CrossRef](#)]
62. Bronte, V.; Pittet, M.J. The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity* **2013**, *39*, 806–818. [[CrossRef](#)]
63. 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* **2010**, *5*, e13124. [[CrossRef](#)]
64. Russo, R.C.; Savino, B.; Mirolo, M.; Buracchi, C.; Germano, G.; Anselmo, A.; Zammataro, L.; Pasqualini, F.; Mantovani, A.; Locati, M.; et al. The Atypical Chemokine Receptor ACKR2 Drives Pulmonary Fibrosis by Tuning Influx of CCR2<sup>+</sup> and CCR5<sup>+</sup> IFN $\gamma$ -Producing  $\gamma\delta$ T Cells in Mice. *Am. J. Physiol. -Lung Cell. Mol. Physiol.* **2018**, *314*, L1010–L1025. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Vieira-Santos, F.; Leal-Silva, T.; de Lima Silva Padrão, L.; Ruas, A.C.L.; Nogueira, D.S.; Kraemer, L.; Oliveira, F.M.S.; Caliar, M.V.; Russo, R.C.; Fujiwara, R.T.; et al. Concomitant Experimental Coinfection by Plasmodium Berghei NK65-NY and Ascaris Suum Downregulates the Ascaris-Specific Immune Response and Potentiates Ascaris-Associated Lung Pathology. *Malar. J.* **2021**, *20*, 296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Resende, N.M.; Gazzinelli-Guimarães, P.H.; Barbosa, F.S.; Oliveira, L.M.; Nogueira, D.S.; Gazzinelli-Guimarães, A.C.; Gonçalves, M.T.P.; Amorim, C.C.O.; Oliveira, F.M.S.; Caliar, M.V.; et al. New Insights into the Immunopathology of Early Toxocara Canis Infection in Mice. *Parasites Vectors* **2015**, *8*, 354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.