



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

FRANCISNAIRA DA SILVA SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DA CHALCONA E-1-
BENZO[D][1,3] DIOXOL-5-IL-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL) PROP-2-
EN-1-ONA CONTRA *Leishmania braziliensis***

Salvador

2023

FRANCISNAIRA DA SILVA SANTOS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DA CHALCONA E-1-BENZO[D][1,3] DIOXOL-5-IL-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL) PROP-2-EN-1-ONA CONTRA *Leishmania braziliensis*

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação Stricto Sensu Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

Linha de Pesquisa I: Prospecção de Fármacos e Recursos Naturais

Salvador

2023

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

S237a

Santos, Francisnaira da Silva

Avaliação da atividade e do mecanismo de ação da chalcona inédita
E-1- BENZO[D][1,3]
DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)
PROP-2-EN-1-*contra Leishmania braziliensis* / Francisnaira da Silva
Santos. - Salvador, 2023.

112 fls : il.

Orientador(a): Profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães.

Inclui Referências

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da
Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2023.

1.Chalcona. 2..L. *braziliensis*. 3.Leishmaniose.

CDD: 615

Salvador

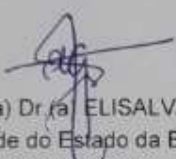
2023

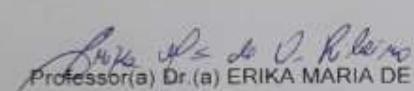
FOLHA DE APROVAÇÃO

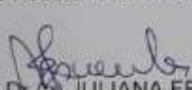
"AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO MECANISMO DE AÇÃO DA CHALCONA E-1-BENZO[D][1,3] DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA, CONTRA LEISHMANIA BRAZILIENSIS"

FRANCISNAIRA DA SILVA SANTOS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 15 de dezembro de 2023, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:


Professor(a) Dr.(a) ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Patologia
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz /BA


Professor(a) Dr.(a) ERIKA MARIA DE OLIVEIRA RIBEIRO
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Química
Universidade Federal da Bahia


Professor(a) Dr.(a) JULIANA FRAGA VASCONCELOS
Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública - EBMSP
Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Universidade Estadual de Feira de Santana

Dedicatória

A minha mãe Normélia e a meu pai
Manoel Francisco por terem me amado
até o fim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais por todos os esforços que fizeram ao longo da vida para que me tornasse quem sou, por todas vezes que renunciaram seus sonhos para que eu pudesse viver os meus, pelo amor, carinho e atenção que sempre tiveram comigo, por terem me ensinado o caminho a seguir vocês vivem em mim, meu amor e gratidão a vocês é eterno. Agradeço a Caio pela doçura do seu amor, companheirismo, paciências e sabedoria nos momentos mais difíceis meu irmão Odílio e a minha irmã Daniely por serem meus parceiros de uma vida toda.

A Pró Liu, pela maneira generosa como conduz seus alunos pela paciência e ética, por está sempre disposta a transmitir seu conhecimento e amor.

A Gabriela Grimaldi e Alexandre Santiago pelo compartilhamento de conhecimento nos momentos iniciais dessa jornada. A Cassio Meira, Tatiana Barbosa, Izabela Cesar e Gleice Rayanne por toda ajuda e disponibilidade. As mestrandas Ivana e Mariana e as alunas de iniciação científica Catarina e Beatriz, pela parceria e apoio que tornou o caminho muito mais leve. Vocês foram essenciais em cada etapa dessa caminhada. Gratidão pela união e companheirismo!

Agradeço aos pesquisadores da UFPB por cederem a molécula pela parceria e trocas durante todo esse período.

A Dra. Milena Soares por abrir as portas do laboratório e permitir que esse projeto fosse realizado.

Minha gratidão a todos os funcionários e professores do PPGFARMA que contribuíram.

RESUMO

SANTOS, S. F. **Avaliação da atividade e do mecanismo de ação da chalcona E-1- benzo [d][1,3] dioxol-5-il-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona contra *Leishmania braziliensis*** (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2023; 58p.

INTRODUÇÃO: A leishmaniose faz parte de um complexo de doenças tropicais negligenciadas. O tratamento utilizado para estas doenças é o mesmo há décadas e está associado a efeitos adversos graves, elevada toxicidade, administração dolorosa, alto custo e crescente resistência medicamentosa. Neste contexto, torna-se necessária a identificação de novas alternativas terapêuticas com ação leishmanicida. **OBJETIVO:** Este trabalho teve como objetivo a investigação da atividade e do mecanismo de ação da chalcona E-1- benzo [d][1,3] dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (FERAI) contra *Leishmania braziliensis*. **MATERIAS E MÉTODOS:** A avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos da linhagem J774 e da viabilidade frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com FERAi foi mensurada utilizando o teste do Alamar Blue®. O número de macrófagos infectados e o número de amastigotas/100 células foi determinado por contagem direta em microscópio óptico. A análise do padrão de morte celular e a influência do FERAi sobre o potencial da membrana mitocondrial, na produção de espécies reativas de oxigênio e na indução de morte celular em promastigotas foi avaliada por citometria de fluxo. As alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura. Por fim, o ensaio de terapia combinada foi realizado com o intuito de avaliar a interação farmacológica entre o FERAi e anfotericina B. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** O FERAi foi cerca de dezoito vezes menos citotóxico que a anfotericina B (FERAI: CC₅₀ = 66 ± 0,12 µM; anfotericina B: CC₅₀ = 3,6 ± 0,50 µM). Além disso, a chalcona inibiu a proliferação de promastigotas e de amastigotas de *L. braziliensis* (IC₅₀ = 9,75 ± 1,7 µM; 10,13 ± 0,05 µM, respectivamente), sendo cerca seis vezes mais seletivo para os parasitos do que para células. O FERAi reduziu de forma significativa a concentração de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e o número de parasitos intracelulares/macrófagos quando comparado com o controle negativo. O FERAi induziu a morte celular de promastigotas por apoptose. Além disso, o FERAi provocou alterações no potencial da membrana mitocondrial e aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *L. braziliensis*. Alterações à nível celular também foram observadas após o tratamento com FERAi como a retração do corpo celular, formação de vacúolos lipídicos, afrouxamento e lise de membrana. A combinação do FERAi e anfotericina B revelou efeito sinérgico contra as formas promastigotas de *L. braziliensis*. **CONCLUSÕES:** Esse trabalho demonstra a atividade antileishmania inédita e promissora do FERAi, em ensaios *in vitro*.

Palavras-chave: Chalcona; *Leishmania braziliensis*; Mecanismo de ação.

ABSTRACT

SANTOS, S. F. **Evaluation of the activity and mechanism of action of the chalcone E-1- benzo [d][1,3] dioxol-5-yl)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one against *Leishmania braziliensis*** (dissertation). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2023; 58p.

INTRODUCTION: Leishmaniasis is part of a complex of neglected tropical diseases. The treatment used for these diseases has been the same for decades and is associated with serious adverse effects, high toxicity, painful administration, high cost and increasing drug resistance. In this context, it is necessary to identify new therapeutic alternatives with leishmanicidal action. **OBJECTIVE:** This study investigated the activity and mechanism of action of the chalcone E-1- benzo [d][1,3] dioxol-5-yl)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one (FERAI) against *Leishmania braziliensis*. **MATERIALS AND METHODS:** The evaluation of cytotoxicity in murine macrophages of the J774 strain and viability against promastigotes and amastigotes forms of *L. braziliensis* after treatment with FERA was measured using the Alamar Blue® test. The number of infected macrophages and the number of amastigotes/100 cells were determined by direct counting under an optical microscope. The analysis of the cell death pattern, the influence of FERA on mitochondrial membrane potential, production of reactive oxygen species and induction of cell death in promastigotes was evaluated by flow cytometry. Ultrastructural changes in *L. braziliensis* promastigotes were evaluated by transmission electron microscopy and scanning electron microscopy. Finally, the combined therapy test was carried out with the aim of evaluating the pharmacological interaction between FERA and amphotericin B. **RESULTS AND DISCUSSION:** FERA was about eighteen times less cytotoxic than amphotericin B (FERA: $CC_{50} = 66 \pm 0.12 \mu M$; ANFO B: $CC_{50} = 3.6 \pm 0.50 \mu M$). Furthermore, this chalcone inhibited the proliferation of *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes ($IC_{50} = 9.75 \pm 1.7 \mu M$; $10.13 \pm 0.05 \mu M$, respectively), being approximately six times more selective for parasites than for cells. FERA reduced the percentage of macrophages infected by *L. braziliensis* and the number of intracellular parasites/macrophages in a concentration-dependent manner, when compared to the negative control. FERA induced cell death of promastigotes by apoptosis. In addition, FERA caused changes in mitochondrial membrane potential and increased the production of reactive oxygen species in *L. braziliensis* promastigotes. Changes at the cellular level were also observed after treatment, such as cell body retraction, formation of lipid vacuoles, membrane loosening and lysis. The combination of FERA and amphotericin B revealed a synergistic effect against of *L. braziliensis* promastigotes. **CONCLUSIONS:** This study demonstrates the unprecedented and promising antileishmanial activity of FERA, in *in vitro* assays.

Keywords: Chalcone; *Leishmania braziliensis*; Mechanism of action.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AMB - Anfotericina B (do inglês: *Amphotericin B*)

ATP - Adenosina trifosfato

BCG - Bacilo *Calmette-Guérin*

CC₅₀ - Concentração citotóxica de 50% (do inglês: *50% cytotoxicity concentration*)

DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbeco (do inglês: *Dulbecco's modified Eagle medium*)

DTH - Testes de hipersensibilidade cutânea tardia (do inglês: *Delayed Type Hypersensitivity*)

ELISA - Ensaio imunoenzimático (do inglês: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)

FERAI - E-1- BENZO[D][1,3] DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)

PROP-2-EN-1-ONA

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

GP63 - Glicoproteína 63

H₂DCFDA - Diacetato de 2'7'- diclorodihidrofluoresceína (do inglês: *2'7'-diacetate dichlorodihydrofluorescein*).

IDRM - Intradermorreação de Montenegro

IC₅₀ - Concentração inibitória de 50% (do inglês: *50% inhibitory concentration*)

IFN - Interferon

IGM - Instituto Gonçalo Moniz

IL - Interleucina

IS - Índice de seletividade

LHCC/UNEB - Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular da Universidade do Estado da Bahia

LETI/FIOCRUZ-BA - Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia da Fundação Oswaldo Cruz/BA.

LV - Leishmaniose visceral

LPG - Lipofosfoglicano

LT - Leishmaniose tegumentar

LTA - Leishmaniose tegumentar americana

GTP - Guanosina trifosfato

MEV - Microscopia eletrônica de varredura

MET - Microscopia eletrônica de transmissão.

MS - Ministério da Saúde

OMS - Organização Mundial da Saúde (do inglês: *World Health Organization*)

OPAS - Organização Pan-Americana da Saúde

PAR - Paramomicina

PCR - Polymerase Chain Reaction

PBS - Tampão fosfato-salina (do inglês: *phosphate buffered saline*)

PI - Iodeto de propídeo (do inglês: *propidium iodide*)

ROS- Espécie reativa de oxigênio (do inglês: *reactive oxygen species*)

SBF - Soro bovino fetal

SEM - Erro padrão da média (do inglês: *standard error of the mean*)

SUS – Sistema Único de Saúde

TH - Linfócito T auxiliar (do inglês: *T helper lymphocyte*)

TNF- α - Fator de necrose tumoral (do inglês: *tumor necrosis factor*)

Treg - Linfócitos T reguladores

UNEB - Universidade do Estado da Bahia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Incidência mundial das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea e (B) leishmaniose visceral	18
Figura 2 - Ciclo de vida de parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	20
Figura 3 - Formas clínicas das leishmanioses.....	23
Figura 4 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes.....	25
Figura 5 - Estrutura química anfotericina B	27
Figura 6 - Estrutura química da miltefosina.....	28
Figura 7 - Estrutura química da pentamidina.....	29
Figura 8 - Estrutura química da paramomicina.....	30
Figura 9 - Estrutura química base das chalconas.	36
Figura 10 - Estrutura química base da Licochalcona A.....	37
Figura 11 - Estrutura química chalcona (E)-1-benzo[d] [1,3] dioxol-5-il)-3-(3bromo-4-etoxi-5- metoxifenil) prop-2-en-1-ona (FERAI).....	39
Figura 12- Efeito do FERAi contra parasitos intracelulares de <i>L. braziliensis</i>	46
Figura 13 - Alterações ultraestruturais em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após o tratamento com FERAi. Microscopia eletrônica de varredura e Microscopia eletrônica de transmissão	48
Figura 14 - Padrão de morte celular por citometria de fluxo.....	50
Figura 15 - Potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de <i>L. braziliensis</i> após tratamento com o FERAi..	51
Figura 16 - Avaliação dos níveis intracelulares de ROS em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> induzida por FERAi em diferentes concentrações.....	53
Figura 17 - Isoblograma descrevendo os efeitos de sinergismo entre FERAi e anfotericina B sobre promastigotas de <i>L. braziliensis</i>	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, seus respectivos custos, esquemas terapêuticos, duração de tratamento, principais efeitos colaterais e forma clínica a qual é indicado.	31
Tabela 2 - Citotoxicidade e atividade do FERAI contra formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	44
Tabela 3 - Redução da concentração e índice de combinação por FERAI e anfotericina B.	54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 Geral.....	16
2.2 Específicos	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	17
3.1 Aspectos Epidemiológicos.....	17
3.2 A Infecção por Leishmania	19
3.3 Resposta Imune nas Leishmanioses.....	21
3.4 Manifestações Clínicas.....	22
3.5 Diagnóstico.....	24
3.6 Tratamentos Disponíveis.....	24
3.6.1 Terapia Combinada	34
3.7 Desenvolvimento de novos fármacos.....	35
3.7.1 Chalconas	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 Molécula	38
4.2 Cultivo de macrófagos.....	39
4. 3 Parasitos	39
4.4 Teste de citotoxicidade sobre macrófagos <i>in vitro</i>	40
4.5 Ensaio de viabilidade celular	40
4.6 Infecção de macrófagos <i>in vitro</i>	40
4.7 Avaliação do índice de seletividade	41
4.8 Microscopia eletrônica de varredura	41
4.9 Microscopia eletrônica de transmissão.....	41
4.9.1 Avaliação do padrão de morte celular	42
4.9.2 Análise do potencial da membrana mitocondrial	42

4.9.3 Espécies reativas de oxigênio	43
4.9.4 Terapia Combinada	43
5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
6.1 Avaliação da Citotoxicidade do FERAI	44
6.2 O FERAI inibe a proliferação de promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	45
6.3 FERAI inibe a infecção de macrófagos por <i>Leishmania braziliensis</i>	45
7.0 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO	47
7.1 Alterações ultraestruturais no parasito após tratamento com FERAI	47
7.2 FERAI induz apoptose em promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	48
7.3 FERAI altera potencial de membrana mitocôndrial ($\Delta\psi_m$)	50
7.4 FERAI altera a produção de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de <i>Leishmania braziliensis</i>	52
7.5 Efeito sinérgico do FERAI e anfotericina B.....	53
8. CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXOS	67
Anexo A. Comprovante de submissão do artigo 1 na revista Journal of Molecular Structure.....	67
Anexo B. Artigo 1 submetido à revista Journal of Molecular Structure.....	68
Anexo C. Artigo 2 (Brief Report) em fase de submissão à revista Journal of Antimicrobial Therapy (JAC).....	101

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças zoonóticas com transmissão vetorial e ciclo de transmissão complexo, que envolve uma pluralidade de parasitos, reservatórios e vetores (OMS, 2021). Estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas são afetadas por esta doença, com aproximadamente 700.000 a 1 milhão de novos casos/ano e 350 milhões de pessoas vivem em área de risco. É considerada a segunda principal causa de morte por parasitos, responsável por aproximadamente 30.000 mortes por ano (OMS, 2020). No Brasil, 18.225 casos de leishmaniose foram notificados principalmente nas regiões norte e nordeste em 2019 (Brasil, 2021).

A doença é transmitida ao hospedeiro vertebrado por meio do repasto sanguíneo realizado pela fêmea do flebotômíneo infectado com o protozoário do gênero *Leishmania* (Bates, 2018). As manifestações clínicas podem se estabelecer após a picada e classificam-se sob duas formas distintas: a Leishmaniose Visceral (LV) e a Leishmaniose Tegumentar (LT). O nível de gravidade está relacionado com a espécie do parasito inoculada pelo vetor e a resposta imune do hospedeiro (Brasil, 2017).

O tratamento farmacológico de primeira escolha para todos os tipos de manifestações clínicas consiste na utilização dos antimoniais pentavalentes, o estibogluconato de sódio (Pentostan®) e o antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®), que são fármacos eficazes, porém, a elevada toxicidade traz impactos negativos para a terapia (Lúcia, 2016). Seus efeitos adversos incluem dor abdominal, vômito, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (Hendrickx *et al.*, 2019).

Nos casos de contraindicações ou resistência a esses medicamentos, como alternativas terapêuticas são utilizados fármacos de segunda linha: a anfotericina B, a paramomicina e a pentamidina (Lima *et al.*, 2017). Todos esses compostos não foram desenvolvidos inicialmente para tratamento contra a leishmaniose e apresentam uma série de limitações, que incluem a aplicação dolorosa, a exigência de administração prolongada e a necessidade de hospitalização (Romero & Lopez, 2017; Tiwari, 2018). Este cenário demonstra a urgência na busca de substâncias ativas, de fácil administração, com menor toxicidade e maior eficácia no combate da doença. Essa perspectiva foi intensificada nos últimos anos através de diversos compostos

isolados que vêm demonstrando propriedades bioativas promissoras, a exemplo de flavonoides, alcaloides e compostos fenólicos (Sandilyan *et al.*, 2018; Kloostern, 2016).

Os flavonoides são compostos biossintéticos encontrados nos vegetais com ação comprovada em pesquisas na área da saúde (Martens & Mithofer, 2006). As chalconas são bioprecursoras dos flavonoides que despertam grande interesse químico/farmacológico, sobretudo devido a sua estrutura relativamente simples e a diversidade de atividades farmacológicas como a atividade antiparasitária e anti-inflamatória (Vanangamudi *et al.*, 2017; Mohamad *et al.*, 2016; Nassar *et al.*, 2016; Özdemir *et al.*, 2015).

O grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Luís César Rodrigues na Universidade Federal da Paraíba sintetizou uma série de chalconas e estudos preliminares *in silico* demonstraram uma possível predição destas moléculas para atividade antileishmania. Em colaboração com este grupo de pesquisa, o nosso trabalho visa a investigação da atividade antileishmania *in vitro*, bem como do mecanismo de ação da chalcona E-1-benzo [d] [1,3] dioxol-5-il-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona, o FERAI, frente à formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania braziliensis*, visando a prospecção de terapia alternativa para as leishmanioses.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a atividade do FERAI contra *Leishmania braziliensis in vitro*, bem como o seu mecanismo de ação.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade do composto em estudo;
- Investigar a atividade antileishmania do FERAI contra formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*;
- Investigar o possível padrão de morte celular após o tratamento com FERAI;
- Investigar a influência da molécula em alterar o potencial de membrana mitocondrial do parasito;
- Averiguar a produção de espécies reativas de oxigênio mediante o tratamento de promastigotas com o composto;
- Analisar as alterações ultraestruturais em promastigotas após tratamento com o FERAI;
- Avaliar a possível interação farmacológica entre o FERAI e anfotericina B.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

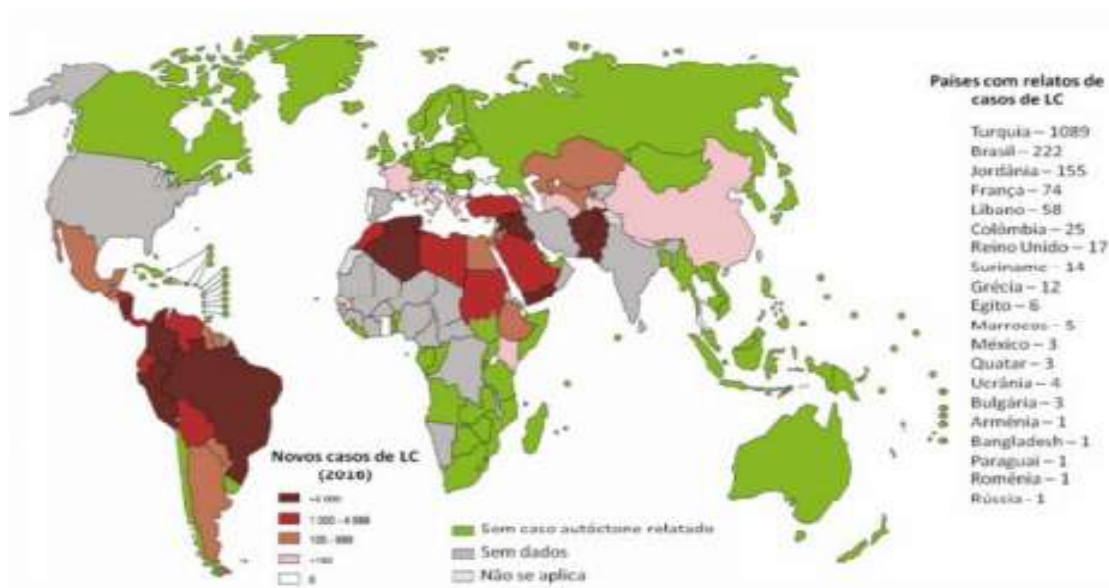
A leishmaniose é uma doença crônica, não contagiosa, e com transmissão por vetores. É considerada uma doença com ampla distribuição no mundo, e prevalente em todos os continentes, afeta a saúde e o trabalho do indivíduo acometido. Apesar da importância clínica, ainda apresenta-se negligenciada e demanda prevenção, controle dos vetores e de seus reservatórios (Júnior *et al.*, 2021; Dominicis *et al.*, 2018).

A doença está presente em cinco dos seis continentes com casos citados por 98 países (Figura 1). Dados publicados pela OMS em 2020, relatam que 56 países são endêmicos de leishmaniose visceral e 59 países endêmicos de leishmaniose tegumentar (OMS, 2020).

A Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) relatou que 17 países endêmicos reportaram 989.096 casos de leishmaniose cutânea (LC) no período de 2001 a 2018, com média anual de 54.950 casos da doença. Em 2020, mais de 90% dos casos globais de leishmaniose foram relatados em seis países: Brasil, Somália, Sudão do Sul, Etiópia, Índia e Quênia. A leishmaniose visceral (LV) é endêmica em 13 países das Américas, cerca de 65.934 novos casos foram registrados entre os anos de 2001 e 2019, apresentando uma média de 3.470 casos por ano (OPAS, 2020). No Brasil, nas últimas décadas, diferentes pesquisas têm demonstrado expansão das leishmanioses (Cardim *et al.*, 2013; Sevá *et al.*, 2017). Em 2017 a OPAS, relatou 17.486 casos de LT e 4.115 casos de LV (Oliveira *et al.*, 2020).

Alguns fatores estão relacionados com esses dados, como as profundas e rápidas mudanças nos aspectos socioeconômicos e ambientais, além da complexidade clínica, biológica e epidemiológica das leishmanioses (Tedesqui *et al.*, 2012; Brito *et al.*, 2019).

A



B

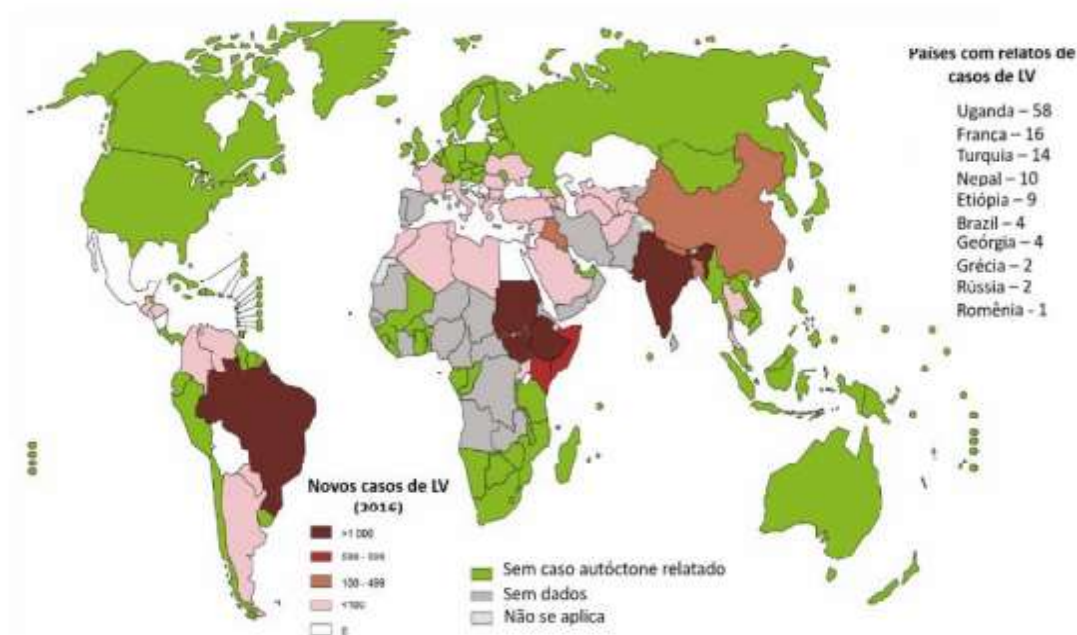


Figura 1 - Incidência mundial das leishmanioses. (A) leishmaniose cutânea e (B) leishmaniose visceral (Adaptado de OMS, 2018).

3.2 A INFECÇÃO POR LEISHMANIA

Protozoários do gênero *Leishmania* apresentam ciclo de vida digenético ou heteroxênico, isto é, necessitam parasitar hospedeiros vertebrados e invertebrados (insetos vetores) para sobreviver. Estes últimos são os responsáveis pela transmissão do parasito de um mamífero a outro (Gontijo & Carvalho, 2003; Cecílio *et al.*, 2014).

A transmissão da leishmaniose ocorre pela picada das fêmeas do flebotomíneo da subfamília *Phlebotominae*, pertencentes ao gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Estes vetores naturais da leishmania são conhecidos popularmente como “asa dura”, “birigui” e “mosquito palha”, de acordo com a região em que são encontrados. No Brasil, os principais flebotomíneos associados à transmissão dessa enfermidade são a *L. Longipalpis* e a *L. cruzi* (Benassi *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2019).

O desenvolvimento da leishmania no flebótomo está intimamente relacionada com a capacidade do parasito sobreviver, multiplicar-se e diferenciar-se dentro do trato digestório do vetor, e dessa forma transmitir a doença ao hospedeiro definitivo, o vertebrado (Afonso, 2013).

Estes protozoários apresentam dois estágios evolutivos bem distintos (Lago *et al.*, 2019). As formas promastigotas extracelulares, alongada, flagelada, móvel e as formas amastigotas, as quais são intracelulares obrigatórias, esféricas ou ovais e com cinetoplasto localizado próximo ao núcleo (Hussaini *et al.*, 2017; Anversa *et al.*, 2018). O ciclo de vida inicia no momento do repasto sanguíneo do inseto vetor infectado, no qual as fêmeas do flebotomíneo ingerem macrófagos infectados com as formas amastigotas e, em seu trato digestivo, estes liberam o parasito que se aloja no intestino médio do vetor, se diferenciando em forma promastigota procíclica.

Em seguida, as leishmanias migram para a porção anterior do tubo digestivo onde ocorre a metaciclogênese, estágio no qual as formas atingem o estado infectivo (Silva, 2017). Este processo é importante para o protozoário, pois ocorrem alterações nos constituintes de membrana da forma promastigota, aquisição de lipofosfoglicano (LPG) e da glicoproteína (GP63), os quais representam os principais fatores de virulência do protozoário (Queiroz, 2019).

Durante o repasto sanguíneo do vetor agora infectado, as formas promastigotas são regurgitadas através da picada. Inicialmente são fagocitadas por células como os neutrófilos e posteriormente por macrófagos, pois a inserção da

probóscide do vetor no hospedeiro resulta em um pequeno processo inflamatório localizado (Lima, 2018; Kaye & Scott, 2011). Nos macrófagos infectados, os parasitos habitam os vacúolos parasitóforos fundidos com lisossomos, sob ação de enzimas, alteração de pH e temperatura. No interior desses vacúolos, se diferenciam em amastigotas e multiplicam-se por divisão binária levando as células hospedeiras ao rompimento, posteriormente as formas amastigotas infectam as células adjacentes, continuando o ciclo infectivo (Lima, 2018).

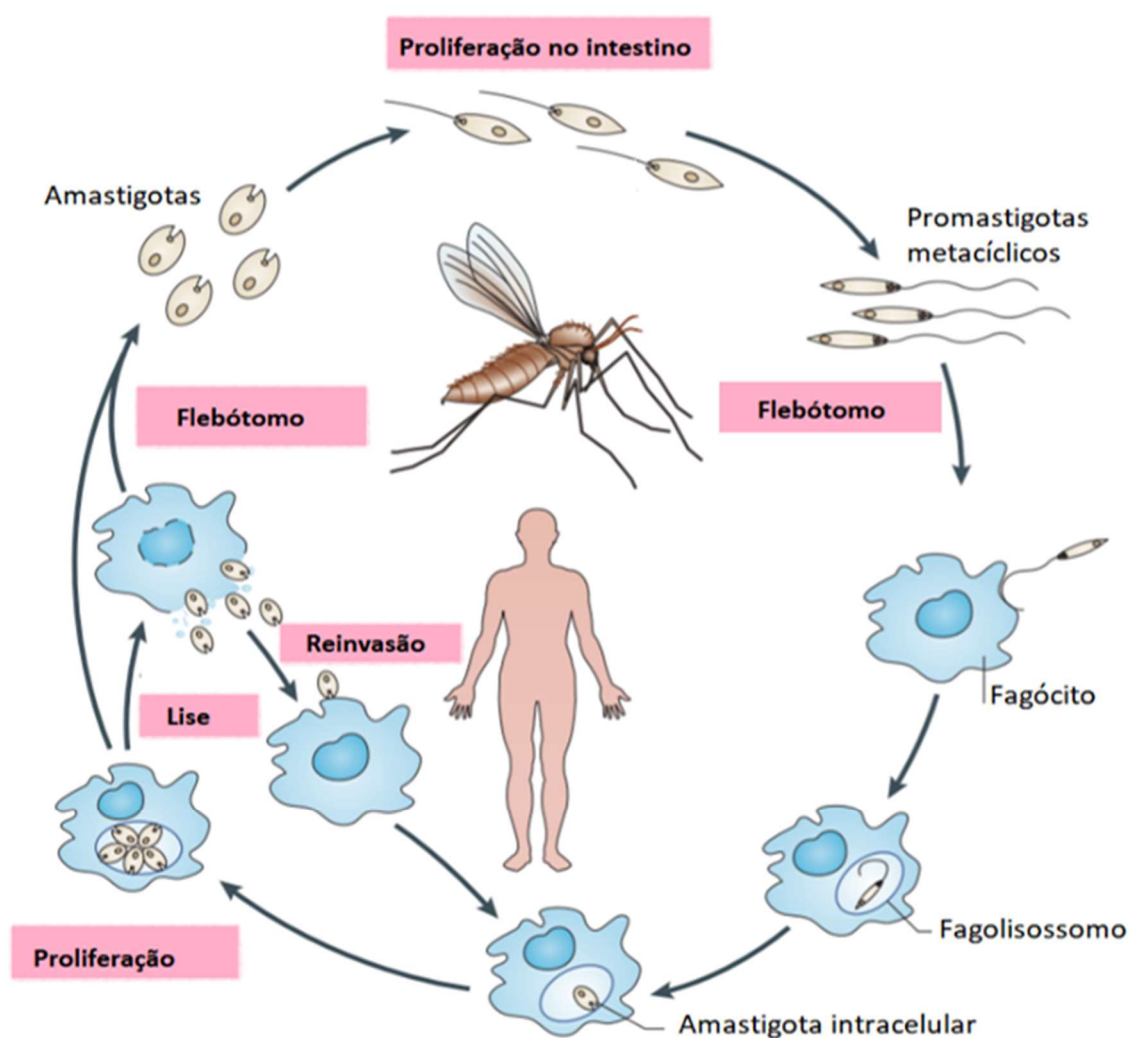


Figura 2 - Ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania* (Adaptado de Kaye, 2011).

3.3 RESPOSTA IMUNE NAS LEISHMANIOSES

O sistema imunológico é essencial na defesa contra os diversos tipos de antígenos parasitários. Nas infecções por protozoários patogênicos, por exemplo, a resposta imunológica tem função primordial no impedimento da ocorrência de infecções disseminadas (Kevric *et al.*, 2015). Para que ocorra a infecção, é necessário que o hospedeiro ofereça condições de crescimento ao parasito e cabe a este apresentar habilidades de evadir-se da resposta imune, através de mecanismos que garantam a sua sobrevivência (Tawari *et al.*, 2018).

Nas leishmanioses, após a picada do flebotomíneo, promastigotas são fagocitadas e processadas por células apresentadoras de antígenos (APCs), as quais apresentam fragmentos do parasito a linfócitos T virgens (Th0). Após diferenciação, estas células produzem um padrão de citocinas que resultam na formação de populações diferenciadas de células T: células Th1, Th2, Th17 e Treg. (Tawari *et al.*, 2018).

Uma vez ativadas, as células Th1 CD4⁺ produzem principalmente a IL-2, a IL-12 e o IFN- γ . Macrófagos ativados pelo IFN- γ produzem o TNF- α , uma citocina com importante função na erradicação dos protozoários. Além disso, uma vez ativados, os macrófagos tornam-se essenciais para eliminação do parasito através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), de óxido nítrico (NO) e de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) altamente tóxicos (Feijó *et al.*, 2016). As células T- reg quando ativadas modulam a resposta antimicrobiana em curso, limitando assim os danos ao hospedeiro. Quando há predomínio da resposta Th2, a resposta Th1 é inibida e a infecção permanece com tendência a disseminação (Gupta *et al.*, 2013; Kevric *et al.*, 2015). As células do tipo Th2 secretam as citocinas IL-4, IL-5, IL-13 e TGF- β que impedem uma resposta efetiva contra patógenos intracelulares (Figueiredo, 2012; Silva, 2020).

Além dos linfócitos Th1, Th2 e Treg, os linfócitos Th17 desempenham papel essencial na regulação do sistema imune, prevenindo o desenvolvimento de muitos transtornos inflamatórios (Pitta *et al.*, 2009). Os linfócitos Th17 são relevantes na regulação da resposta imunológica contra leishmania, apesar de sua atuação ainda não ter sido totalmente elucidada, alguns autores sugerem que estas células atuam no recrutamento de neutrófilos modulando a síntese de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias no local da lesão (Gonçalves De Albuquerque *et al.*, 2017). A infecção por

leishmania estimula a produção de IL-17 (Anderson *et al.*, 2009; Boaventura *et al.*, 2010) assim níveis elevados desta citocina foram observados em pacientes com leishmaniose cutânea e mucosa (Ansari *et al.*, 2010; Castilho *et al.*, 2010).

3.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas da leishmaniose ocorrem em um espectro que varia de assintomático a letal. Isso depende da espécie infectante, do vetor, do estado imunológico do hospedeiro, do estado nutricional e da dose de inoculação (Kevric *et al.*, 2015).

A doença pode se manifestar sob duas formas clínicas distintas, a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT) (Brasil, 2017). A leishmaniose visceral (LV) é uma doença sistêmica e letal quando não tratada (OPAS, 2020). É caracterizada pela disseminação dos parasitos para alguns órgãos como o baço, fígado, medula óssea e linfonodos. A visceralização inicia-se com uma febre persistente, a segunda manifestação clínica e a mais comum é o desenvolvimento de um quadro de esplenomegalia, e em menor escala da hepatomegalia (Figura 3A). A doença pode evoluir para formas graves e apresentar elevada letalidade quando não tratada adequadamente (Lima & Batista, 2009). As principais espécies reconhecidas como agentes etiológicos da LV são a *L. donovani*, a *L. infantum*, e a *L. chagasi*. No Brasil, foram identificados parasitos de *L. infantum* e *L. chagasi* envolvidos em casos por todo país (Van Griensven & Diro, 2019).

Nas Américas Central e do Sul, a LT é denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e apresenta amplo espectro clínico (Name *et al.*, 2005; OMS, 2021). A LTA pode ser classificada em cutânea, mucocutânea, cutânea disseminada (Silveira *et al.*, 2009). No Brasil, as principais espécies encontradas são a *L. amazonensis*, a *L. guyanensis* e a *L. braziliensis*, responsável pela forma mais grave da doença (Brasil, 2017).

A leishmaniose cutânea (LC),(Figura 3B) é caracterizada por uma lesão representada por uma única pápula eritematosa típica com formato arredondado ou ovalado e indolor, ou tornar-se dolorosa, quando ocorre coinfeção bacteriana ou quando se situa sobre uma articulação. Esta pode ainda evoluir para a formação de nódulo com possível progressão para cura espontânea, ou ainda progredir para uma doença crônica, com possibilidade de disseminação (Rocha, 2012;Brasil, 2017).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) é secundária à lesão cutânea inicial quando essa é de evolução crônica. É uma manifestação crônica destrutiva e mutilante, presente nas regiões de mucosas do nariz e boca (mais frequentemente nos lábios e no palato). Nos casos mais graves pode atingir a laringe, a traqueia e os brônquios (Figura 3C) (OMS, 2021). Fatores como a idade avançada, a presença de comorbidades e a permanência do agente por mais tempo no organismo podem contribuir na ativação e/ou disseminação da LMC (PASSOS *et al.*, 2015). As lesões ulcerativas são acompanhadas de granulações grosseiras, que podem causar dor, disfagia e odinofagia nos pacientes, que conseqüentemente reduzem a ingestão de alimentos, resultando em uma desnutrição e maior tempo de cicatrização das lesões (Oliveira *et al.*, 2013; Costa *et al.*, 2014).

Na leishmaniose cutânea disseminada (Figura 3D), inicialmente há formação de pápulas discretas com crescimento lento, na forma de nódulos semelhantes a quelóides. A doença pode envolver grandes porções do corpo, porém sem envolver áreas de membranas mucosas. É caracterizada histopatologicamente por granulomas compostos por grandes macrófagos, que contêm leishmanias em grande número em seu citoplasma intensamente vacuolizado (Barroso, 2019; Silveira, 2019).

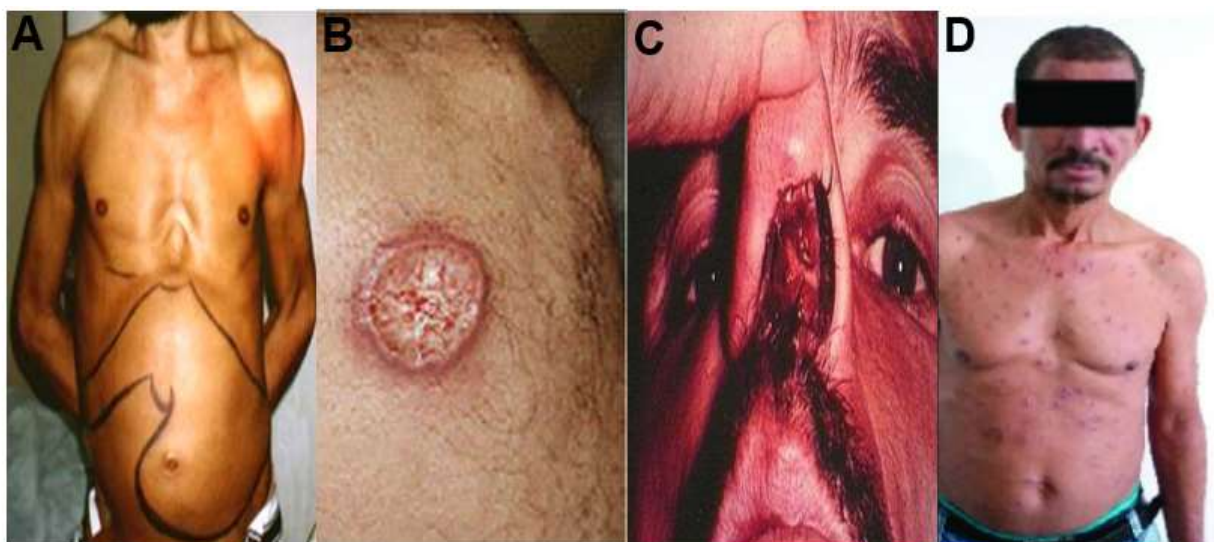


Figura 3 - Formas clínicas das leishmanioses. (A) leishmaniose visceral, (B) leishmaniose cutânea e (C) leishmaniose mucocutânea, (D) Leishmaniose cutânea disseminada (Adaptada de OMS, 2017).

3.5 DIAGNÓSTICO

O diagnóstico da leishmaniose envolve os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, ainda não existe um teste laboratorial que seja considerado padrão ouro, o que torna necessário a combinação de mais de um método (Gomes *et al.*, 2014). A aplicação e a sensibilidade dos métodos variam de acordo com a forma clínica, o tempo de evolução da lesão e a espécie de leishmania envolvida (Andrade *et al.*, 2005).

De acordo com o Ministério da Saúde, pacientes com ulcerações na pele por três semanas ou mais de evolução ou que estejam expostos à área de transmissão da leishmaniose são considerados casos suspeitos. Para esses pacientes recomenda-se que seja feito o exame direto que consiste na identificação das formas amastigotas em lâminas a partir de material obtido da lesão por escarificação e/ou a intradermorreação de Montenegro (IDRM). Se porventura o resultado for positivo, deve-se encaminhar o paciente para o tratamento como prova terapêutica (Brasil, 2018; Martins, 2021; Brazil, 2019). Caso o exame direto ou a IDRM seja negativo, e não haja cura com a prova terapêutica, os pacientes devem ser encaminhados para centros de referência para seguir a investigação diagnóstica com métodos diferenciais (Martins, 2021).

Inúmeras ferramentas também podem ser utilizadas para o diagnóstico como os testes sorológicos *Western Blot* e o *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). O ELISA é considerado uma alternativa rápida, com possibilidade de processamento de um grande número de amostras, porém pode apresentar reação cruzada com doenças como a paracoccidioidomicose e a doença de Chagas, desencadeando resultados falso positivo (Gomes *et al.*, 2014; Gil *et al.*, 2011). Se necessário, ainda podem ser empregadas ferramentas moleculares com o método diferencial Relação em Cadeia da Polimerase (PCR), principalmente nos casos não resolvidos pelos métodos clássicos (Andrade *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2014).

3.6 TRATAMENTOS DISPONÍVEIS

A terapia medicamentosa para todas as formas de leishmaniose tem como objetivo principal a garantia de adesão ao tratamento, alívio dos sintomas e do

desconforto causado pela doença (Brasil, 2018). Infelizmente, todos os fármacos atualmente disponíveis mostram-se insatisfatórios em termos de eficácia, custo, facilidade de administração e/ou segurança (McGwire & Satoskar, 2014; Murray, 2010; Hendrickx, *et al.*, 2019).

O tratamento farmacológico de primeira escolha, para todos os tipos de manifestações clínicas das leishmanioses consiste em fármacos desenvolvidos há mais de 60 anos, os antimoniais pentavalentes: antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio (Figura 4). O estibogluconato de sódio (Pentostam®) está disponível nos Estados Unidos da América, Europa e China, o antimoniato de meglumina (Glucantime®) é comercializado na África e América Latina. No Brasil, este fármaco é distribuído pelo Ministério da Saúde (Lima *et al.*, 2007; Brasil, 2017). Para ambos, as doses administradas são baixas devido à sua elevada toxicidade, o tratamento muitas vezes é descontinuado devido à administração dolorosa (o que torna a terapia ineficiente), e conseqüentemente, predispõe o aumento das formas resistentes do parasito (Rath *et al.*, 2003; Marques, 2019).

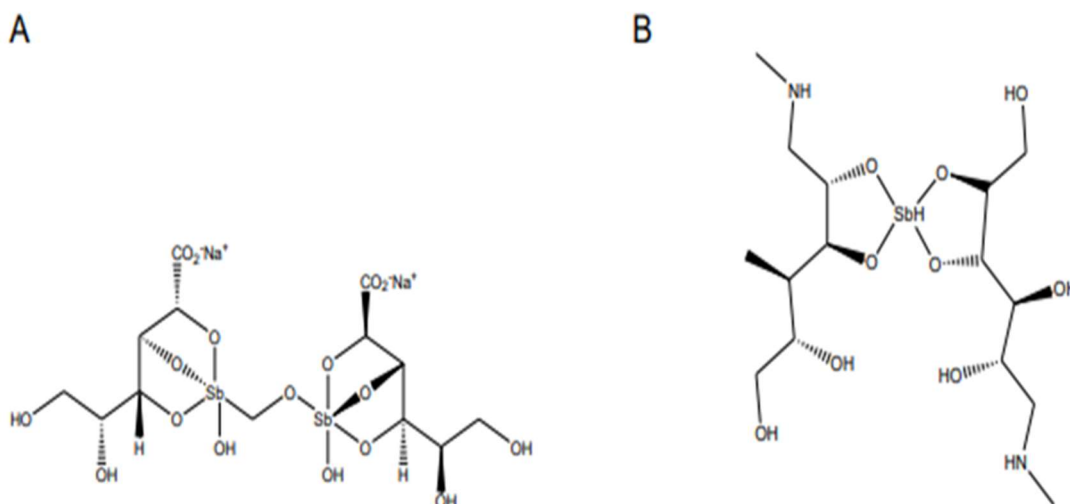


Figura 4 - Estrutura química dos antimoniais pentavalentes: estibogluconato de sódio (A); antimoniato de meglumina (B) (LIMA *et al.*, 2007).

A molécula pentavalente (Sb^{+5}) do antimonial é um pró-fármaco convertido em antimonial trivalente (Sb^{+3}), tornando-se ativo contra a forma amastigota do parasito. Acredita-se que seu possível mecanismo de ação consiste na inibição da glicólise e na oxidação dos ácidos graxos, com consequente redução na produção de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP). Os outros mecanismos de ação abrangem a interferência na síntese de tióis com posterior indução da apoptose e posterior inibição da tripanotona redutase (Berman, 2005; Cataldo *et al.*, 2018; Frézard *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2003; Silva, 2017).

A problemática da utilização dos antimoniais pentavalentes incluem efeitos adversos graves sobre o aparelho cardiovascular, sendo necessária uma maior vigilância com pacientes com idade superior a 50 anos, portadores nefropatias e hepatopatias, devido a elevação transitória das transaminases hepáticas e de toxicidade. Nestes casos, a suspensão ou a redução da dose torna-se necessária (Arboleda *et al.*, 2019; Brasil, 2017; Rath *et al.*, 2003; Sampaio, 2017). Estudos também demonstraram que os antimoniais atravessam a barreira transplacentária, com evidências experimentais de teratogenicidade e embriotoxicidade em camundongos. Por estes motivos, o tratamento não deve ser administrado em gestantes (Brasil, 2017).

Quando não se obtém resposta ao tratamento farmacológico com o antimonial pentavalente, na impossibilidade de seu uso ou no caso de contraindicações, o tratamento de segunda escolha no Brasil inclui a anfotericina B, a paramomicina a pentamidina e a miltefosina (Lima *et al.*, 2007; Wijnant, *et al.*, 2018).

A anfotericina B (AMB) (Figura 5) é um antimicrobiano e fungicida que interfere na bioenergética das formas amastigotas com alta afinidade por membranas contendo esterol. O ergosterol é o principal esteroide presente na membrana plasmática dos parasitos do gênero *Leishmania*, sendo assim, anfotericina B liga-se ao ergosterol, causando desorganização da membrana, formação de poros aquosos, alteração da permeabilidade, extravasamento de conteúdo, desequilíbrio iônico e consequente morte do parasito (Hamill, 2013; Sampaio, 2003; Kip, *et al.*, 2018; Tiwari, *et al.*, 2018).

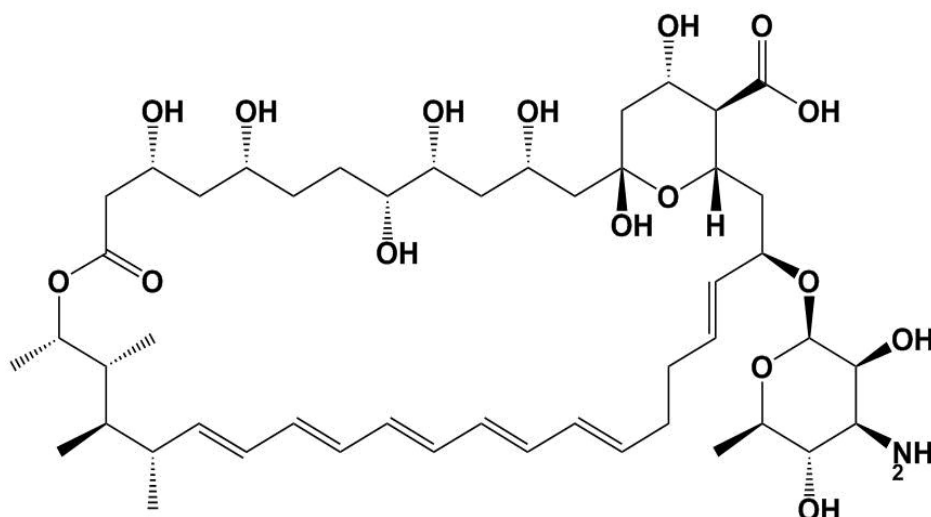


Figura 5 - Estrutura química anfotericina B (LIMA *et al.*, 2007).

Atualmente no Brasil, estão registradas três apresentações de anfotericina B, sendo todas elas formulações injetáveis para uso endovenoso: a Anforicin B® (única formulação disponível no SUS), Abelcet® e formulação contendo o fármaco incorporado a sistemas lipossomas Ambisome® (Brasil, 2019). Apesar de ser uma das alternativas secundárias para o tratamento farmacológico da leishmaniose, a anfotericina B também apresenta efeitos adversos limitantes, como a nefrotoxicidade que é descrita como seu principal efeito adverso (Hendrickx, *et al.*, 2019; Junior, 2012). Estes efeitos foram minimizados com o desenvolvimento da formulação lipossomal. Essa formulação consiste em incorporar a anfotericina B numa bicamada de lipossomas, que resulta numa redução significativa da toxicidade renal relacionada à infusão (Kip, *et al.*, 2018; Tiwari, *et al.*, 2018). A formulação lipossomal apresenta maior afinidade pelo sistema mononuclear fagocitário, sendo fagocitados por monócitos em diferentes velocidades ao alcançarem a circulação sistêmica, reduzindo o acúmulo do fármaco nos rins, o que proporciona aumento do índice terapêutico e redução da toxicidade (Labana *et al.*, 2002).

A tendência dos complexos lipossomais serem capturados pelo sistema fagocitário mononuclear é uma vantagem no caso do tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que a captura dos lipossomas ocorre no fígado, pulmões, e em menor extensão, na medula óssea, resultando na vetorização do fármaco a partir do sistema de liberação (Labana *et al.*, 2002). Em contrapartida, a teratogenicidade é um fator limitante na utilização da formulação, além do alto custo que impossibilita seu

uso por populações de baixa renda, que certamente são os mais afetados pela doença (Kip, *et al.*, 2018).

Outro fármaco que teve sua atividade antileishmania descrita foi a miltefosina, originalmente desenvolvido com ação anti-inflamatória e antineoplásica. A miltefosina (hexadecilfosfocolina) pertence a classe das alquilfosfocolinas, que são ésteres de fosfocolina, álcoois alifáticos de cadeia longa (Figura 6) (Kip, *et al.*, 2018; Tiwari, *et al.*, 2018). Seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, embora tenha sido descrito como relacionado a um efeito direto sobre o parasito ao interferir na biossíntese de fosfolipídios e no metabolismo de alquil-lipídeos, afetando o citocromo c oxidase mitocondrial, induzindo a despolarização mitocondrial, a diminuição dos níveis de ATP e, conseqüentemente, causando morte celular do parasito por apoptose (Ponte-Sucre, *et al.*, 2017).

Em 2018, a miltefosina foi incorporada para o tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral no Brasil pelo Ministério da Saúde, através da Portaria Nº 56/2018, sendo o primeiro medicamento de administração oral licenciado para uso no ambiente hospitalar. Sua administração geralmente é realizada em combinação com outros medicamentos, como a pentamidina (Santarem *et al.*, 2014; Brasil, 2018; Sotoj *et al.*, 2018).

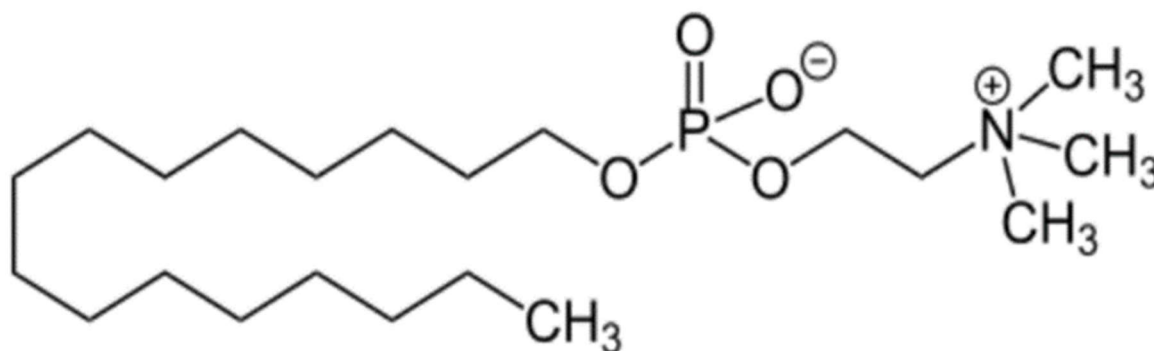


Figura 6 - Estrutura química da miltefosina (LIMA *et al.*, 2007).

Assim como os demais fármacos antileishmania, a miltefosina apresenta efeitos adversos (Tabela 1) além da embriotoxicidade e a teratogenicidade observadas nos estudos pré-clínicos, que tem sido uma das limitações da utilização em gestantes (Vakil *et al.*, 2015; Dorlo *et al.*, 2012). Devido a estes efeitos adversos, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) exige para mulheres em idade fértil a exclusão de gravidez por meio de teste de dosagem de beta-HCG, seguida por

terapia anticoncepciva com o mínimo de dois métodos distintos, sendo um deles de barreira (Brasil, 2020).

A partir da década de 1980, um novo fármaco foi incorporado ao tratamento da leishmaniose e também em casos de profilaxia secundária na coinfeção por HIV-LV, as pentamidinas (isotionato e mesilato) (Figura 7). As pentamidinas são diamidinas aromáticas, compostos orgânicos que se caracterizam por possuir cadeia alceno central inerte unida através de ligação do éter ao grupo amidino polar terminal. Geralmente as pentamidinas são administradas por via parenteral, em injeções intramusculares ou infusões intravenosas (Tiuman *et. al.*, 2011; Sundar & Chakravarty, 2015).

O alvo da ação das pentamidinas é a biossíntese de macromoléculas como DNA, RNA, fosfolipídios e proteínas, que atua modificando a morfologia do cinetoplasto e promovendo a fragmentação da membrana mitocondrial, ocasionando a morte do parasito (Goto & Lindoso, 2010). Como a pentamidina interfere no metabolismo da glicose, a sua administração pode desencadear toxicidade pancreática e picos de hiperglicemia, sendo este o efeito colateral mais frequente (Yang *et al.*, 2016; Wilson *et al.*, 2008; Sereno & Lemesre, 2017).

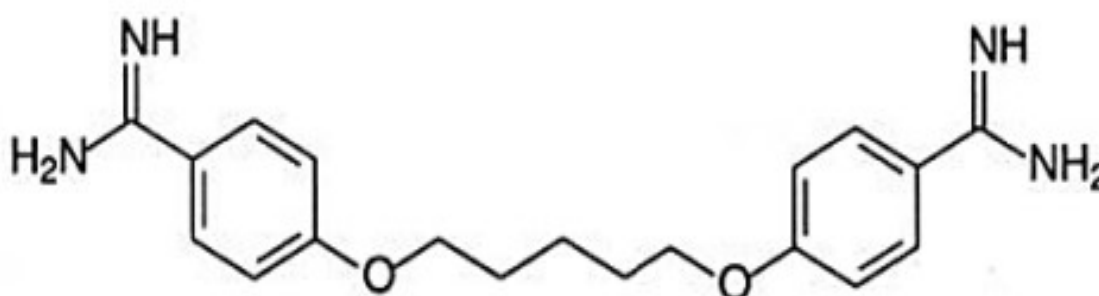


Figura 7 - Estrutura química da pentamidina (COELHO, 2007).

Um dos desafios no tratamento da leishmaniose é a falta de autonomia dos pacientes para a administração dos fármacos, uma vez que as drogas de primeira e segunda escolha são administradas por via endovenosa ou intramuscular, necessitando de um profissional capacitado para tais intervenções, o que pode limitar

o tratamento. Assim, fármacos de uso tópicos com formulações na forma farmacêutica de cremes e loções contendo a paramomicina (PAR), como princípio ativo foi implementada pela OMS após um estudo em países no Leste da África (Sundar & Chakravarty, 2015; Monge-Maillo & López-Vélez, 2013; Zulfiqar; Shelper; Avery, 2017).

A paramomicina (PAR) (Figura 8), também chamada de aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo assim como a gentamicina e a amikacina, derivado da bactéria *Streptomyces rimosus paromomycinus* e considerado de amplo espectro de ação contra diferentes classes de protozoários e bactérias (Petrilli *et al.*, 2018). Seu mecanismo de ação está relacionado à interação com a mitocôndria e a subunidade ribossomal 30s, provocando a inibição da atividade respiratória e síntese proteica, respectivamente (Chakravarty & Sundar, 2019).

A molécula da PAR é altamente hidrossolúvel e composta por cinco grupamentos amino. Estas características acabam limitando sua penetração na pele através do estrato córneo o que, por sua vez, torna-se um fator limitante para o tratamento, exigindo que concentrações mais altas de fármaco sejam utilizadas na formulação de modo compensatório (Gómez Pérez *et al.*, 2016). Alguns estudos demonstram que essas formulações farmacêuticas não são as mais adequadas para potencializar a liberação do fármaco, sendo necessário estudos robustos das formas farmacêuticas mais adequadas para as formulações (Chakravarty & Sundar, 2019).

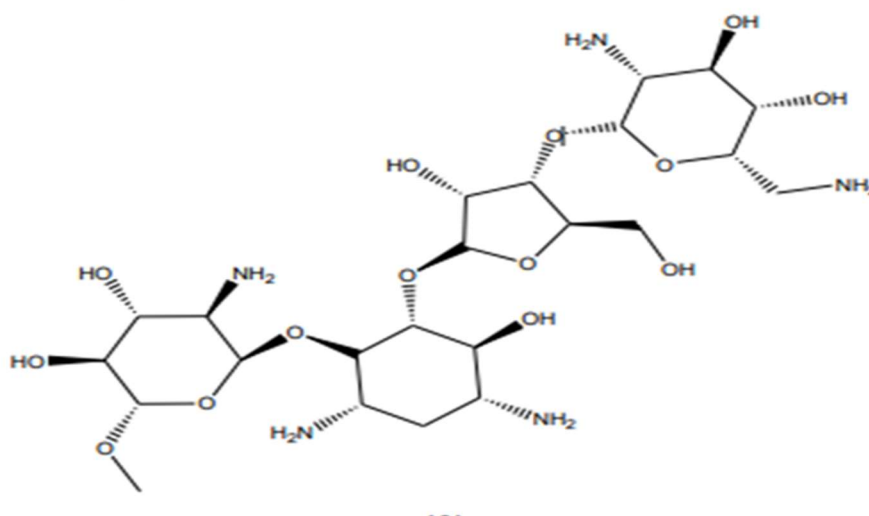


Figura 8 - Estrutura química da paramomicina (COELHO, 2007)

Assim como os demais medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose, a PAR também apresenta limitações relacionadas aos seus efeitos adversos sendo a ototoxicidade o evento adverso clássico, além do zumbido transitório e perda de audição (Davidson Den Boer & Ritmeijer, 2009).

Tabela 1 - Fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses, seus respectivos custos, esquemas terapêuticos, duração de tratamento, principais efeitos colaterais e forma clínica a qual é indicado (Adaptado de Brasil, 2017; Zulfiqar *et al.*, 2017).

Fármaco Valor (\$)	Esquema terapêutico	Duração	Efeitos colaterais	Indicação clínica
Estibogluconato de Sódio \$ 50–198	20 mg/Kg/dia	30 dias	Grave cardiotoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade.	Visceral e cutânea.
N-metil glucamina \$ 50–198	10- 20 mg/Kg/dia	20-30 dias	Dor na musculatura esquelética, náusea, vômito, diarreia, dor abdominal, dor de cabeça, anorexia, astenia, fadiga, febre, exantema, eritema e urticária.	Visceral e cutânea
Anfotericina B Lipossomal \$ 280–3000	2-5 mg/Kg/dia (sem limite de dose máxima diária)	9 dias consecutivos	Febre e tremores ou calafrios.	Visceral
Paramomicina \$ 10–15	15 mg/Kg/dia	21 dias	Vômito, diarreia, ototoxicidade, zumbido transitório,	Visceral e cutânea

			perda de audição, nefrotoxicidade.	
			Dor musculoesquelética	
Pentamidina \$ 99–170	3-4mg/Kg/dia, em dias alternados.	Pelo menos 4 meses ou até que a lesão não seja visível	e abdominal, anorexia, fadiga, abscessos estéreis, náuseas, vômitos, tontura, cefaleia, hipotensão, lipotimias.	Visceral e cutânea
Miltefosina \$ 70–150	2 a 2,5 mg/Kg/dia	28 dias	Vômitos, náusea, cinetose, dor de cabeça e diarreia.	Visceral

Para além do tratamento medicamentoso, há mais de meio século busca-se o desenvolvimento de tecnologias para o controle das leishmanioses por imunoprofilaxia. Apesar de nenhuma vacina humana ter alcançado o status de registro, algumas vacinas humanas estão sendo testadas em ensaios clínicos (Palatnik De Sousa & Nico, 2020).

As pesquisas em imunoprofilaxia visam o desenvolvimento de formulações efetivas e com baixo custo de produção contra a leishmaniose. As formas mais comumente exploradas nos estudos são vacinas recombinantes, vacinas de DNA e vacinas de peptídeos. Entretanto, o maior desafio visto nessa produção é atender as expectativas quanto aos custos e efetividade, o que dificulta a produção de uma vacina humana contra esta doença (Dias *et al.*, 2017).

As vacinas de primeira geração de leishmaniose, que utilizavam parasitos mortos ou atenuados, tinham baixo custo e apresentaram algum sucesso em modelos animais, porém nenhuma delas chegou a ser validada para uso comercial em humanos pela OMS (Moafi *et al.*, 2019).

A vacina que mais avançou nesse sentido foi a Leishvaccine®, utilizada para o tratamento profilático de leishmaniose visceral canina. Ela é composta por promastigotas de *Leishmania amazonensis* mortos e usa BCG como adjuvante. A

vacina induziu o aumento significativo de citocinas como o IFN- γ e o IL-4, estimulando a imunidade inata, principalmente de neutrófilos, eosinófilos células B, TCD4+ e TCD8+ ativas. Foram feitos ensaios das fases I e II em humanos, nos quais se atestou sua segurança e imunogenicidade, mas a Leishvaccine® não atingiu resultados satisfatórios na Fase III em ensaios clínicos randomizados (Jain & Jain, 2015).

Duas vacinas de segunda geração conseguiram versões comerciais para uso veterinário após resultados de estudos de campo, indicadas tanto para proteger cães como para reduzir a transmissão de leishmaniose canina aos humanos pela picada de flebotomíneos são elas a Leishmune® e Leish-Tec® baseadas em antígenos fracionados e em proteínas recombinantes respectivamente (Velez & Gallego, 2020).

A Leishmune® foi à primeira vacina licenciada para leishmaniose canina registrada no Brasil, em 2004. É composta pelo ligante fucose-mannose (FML) de promastigotas de *L. donovani*, e se mostrou adequado para o sorodiagnóstico em cães. Sua eficácia foi testada em ensaios de fase III em área endêmica de leishmaniose visceral. Neste estudo foram utilizadas as saponina Riedel de Haën como adjuvante em 117 cães, os animais vacinados apresentaram soroconversão específica da vacina e reação positiva em testes cutâneos de hipersensibilidade tardia (DTH). Foram observados 4 óbitos no grupo controle e nenhum no grupo vacinal, a eficácia vacinal foi de 76% e a proteção contra a doença de 92%. No entanto, a falta de randomização na amostra e outras deficiências metodológicas não permitiram à validação completa desses resultados. Em 2014 a licença da Leishmune® foi cancelada pela ANVISA devido a falta de evidências da eficácia da vacina nos seus ensaios de fase III (Velez & Gallego, 2020).

A Leish-Tec® é uma vacina composta pela proteína recombinante A2 de amastigotas de *L. donovani* utilizando saponinas como adjuvante, no Brasil foi licenciada em 2007 e atualmente é a única vacina canina autorizada no país (Velez & Gallego, 2020).

Experimentos pré-clínicos mostraram que a imunização com a proteína A2 recombinante conferiu alto grau de proteção a camundongos. A resposta humoral instigada pela vacina foi altamente específica, apresentou imunidade mediada por Th1-Th2 com aumento significativo dos níveis de IFN- γ . Em um estudo posterior a Leish-Tec® induziu imunidade protetora parcial contra a infecção de *L. chagasi* e preveniu uma maior gravidade da doença (Velez & Gallego, 2020). Cães imunizados produziram níveis aumentados de IgG2 anti-A2 após a vacinação, a produção

significativamente maior de IFN- γ foi detectada entre os vacinados quando estimulados com antígeno A2 ou extrato total de proteína de *L. chagasi*. Uma vez comparada com a Leishmune®, não foram encontradas diferenças significativas entre as duas vacinas na resposta humoral ou nas taxas de infecção e transmissão para o flebótomo. Um estudo de campo da Leish-Tec® incluiu mais de 500 cães e observou uma redução significativa no número de casos de leishmaniose canina no grupo vacinado. A eficácia vacinal foi de 71,4% quando avaliada por exames parasitológicos, 58,1% em exames parasitológicos quando associados ao xenodiagnóstico (Velez & Gallego, 2020).

Em relação a vacinas para as leishmanioses humanas ainda não há registros concedidos pela ANVISA. No entanto, alguns protótipos vêm sendo avaliadas em ensaios clínicos como a LEISH-F1, que chegou à Fase II de ensaios clínicos. A LEISH-F1 é composta por um homólogo de um antioxidante tiol específico de *L. major* (TSA), pela proteína-1 indutora de estresse de *L. major* (LmSTI1). Em seus ensaios, a vacina foi eficiente como terapêutica em pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, além de demonstrar ser capaz de induzir imunidade protetora em voluntários saudáveis. Sua sucessora foi a vacina LEISH-F2, que tem mais similaridade com a proteína “natural” das espécies selvagens. Após comprovação de segurança e imunogenicidade, seus resultados foram avaliados em ensaio de fase II, os resultados parciais nessa fase foram considerados insatisfatórios quanto à eficácia sendo assim o estudo foi interrompido (Arce-Fonseca *et al.*, 2015; Palatnik-De-Sousa & Nico, 2020).

3.6.1 TERAPIA COMBINADA

As leishmanioses são as únicas doenças infecciosas causadas por tripanossomatídeos cujo tratamento convencional é predominantemente realizado por drogas reposicionadas, ou seja, farmacologicamente empregadas em outras doenças (Lamotte *et al.*, 2019).

A associação de fármacos consiste na utilização concomitante de dois os mais fármacos biologicamente ativos, que tenham potências semelhantes, atuem por mecanismos de ação diferentes e que apresentem efeito ativo ou sinérgico quando combinados. Essa estratégia tem sido recomendada pela OMS para o tratamento das

leishmanioses (Uliana & Trincni, 2018). A terapia combinada tem como principal objetivo reduzir a duração do tratamento (minimizando os efeitos secundários, melhorando o cumprimento do tratamento), além de diminuir os custos, evitar resistências e alcançar a cura, sobretudo nos casos mais complicados (Monge-Maillo & Vélez, 2021).

Em diferentes países, os estudos clínicos vêm avançando na perspectiva de aprimorar a terapia medicamentosa, como o ensaio realizado no Sudão que avaliou a anfotericina B lipossomal em combinação com a miltefosina, e a combinação entre a paramomicina e a miltefosina. Foram observadas as seguintes taxas de cura: 87% para o esquema de anfotericina B lipossomal associada a miltefosina e 76 % de cura para a combinação paramomicina e a miltefosina (Wasunna *et al.*, 2016).

Em um estudo de fase III na Índia foi avaliada a terapia atualmente recomendada de anfotericina B lipossomal e uma combinação desta com a miltefosina para o tratamento de leishmaniose visceral em pacientes co-infectados com HIV. Até o presente momento, ainda não foram publicados os resultados desse estudo (Roatt *et al.*, 2020).

3.7 DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

O processo de descoberta de um novo fármaco antileishmania submete-se a várias etapas bem estabelecidas, como a escolha do alvo molecular, a seleção de uma ou mais moléculas líderes, a otimização da molécula, a escolha da molécula candidata ao desenvolvimento, os ensaios biológicos *in vitro* e *in vivo*, e os ensaios clínicos até finalmente ser considerado um medicamento (Rang *et al.*, 2004). Os efeitos tóxicos observados na administração dos fármacos disponíveis para o tratamento da leishmaniose e a resistência do parasito reforçam a necessidade de se desenvolver formulações farmacêuticas inovadoras capazes de aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade (Roatt, *et al.*, 2018).

Sendo assim, a elucidação de um composto que estabeleça uma melhor terapia para a leishmaniose, seja por reduzir o tempo de tratamento, os custos, os efeitos adversos ou o surgimento de cepas resistentes, mantém-se como a principal linha de trabalho no esforço de atenuar a endemicidade dessa infecção (Field *et al.*, 2017).

3.7.1 CHALCONAS

Na perspectiva de elucidar novos protótipos candidatos a fármacos, diversas substâncias isoladas vêm demonstrando propriedades bioativas promissoras (Roatt *et al.*, 2020). As chalconas naturais e sintéticas são precursoras dos flavonoides, abundantes na natureza, estão distribuídas nas plantas das famílias Leguminosae, Compositae e Moraceae e presentes em frutas, vegetais, grãos, raízes, frutas e flores. O sistema conjugado das chalconas confere pigmento amarelo às pétalas de algumas plantas de uso medicinal (Mendes, 2019; Zhuang *et al.*, 2017).

O termo chalcona é frequentemente usado para se referir a moléculas que possuem como estrutura base a [1,3-difenil-2-propen-1-ona] (Figura 9) sendo, portanto, cetonas aromáticas que são constituídas por um sistema de carbonila α , β -insaturado que une dois anéis aromáticos. (Nielsen, 2004; Zuanazzi *et al.*, 2001).

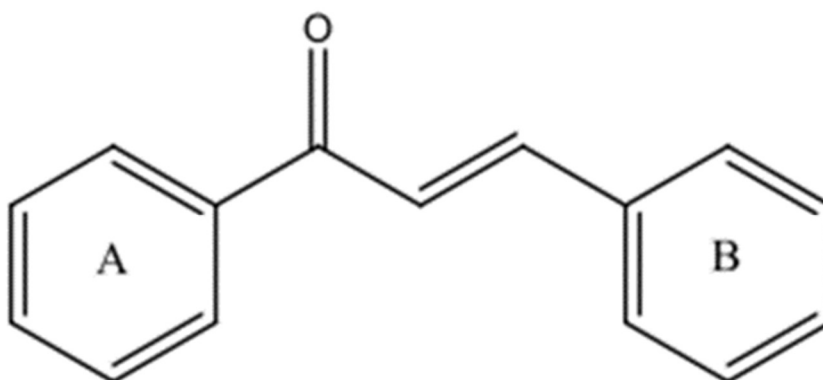


Figura 9 - Estrutura química base das chalconas (Mandge *et al.*, 2007).

Nos últimos 20 anos, a pesquisa química tem se concentrado em chalconas naturais e sintéticas devido à sua estrutura simples, facilidade de construção/obtenção e aplicações biológicas promissoras, incluindo a atividade antibacteriana, anti-inflamatória, antimalárica e antileishmania (Elkanzi *et al.*, 2022; Herencia *et al.*, 2012; Lopez *et al.*, 2001; Kozlowski *et al.*, 2007; Venturelli *et al.*, 2016). Sob o ponto de vista da química medicinal, a relação estrutura-atividade das chalconas permite que modificações ou adições nos seus substituintes sejam realizadas como estratégias relevantes para reduzir a toxicidade e aumentar o potencial biológico (Ko *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Gutteridge *et al.*, 2007). A substituição ou incorporação de novos grupamentos funcionais aos anéis aromáticos das chalconas podem afetar

significativamente as propriedades físico-químicas e a permeabilidade celular, tornando-se um aliado importante no desenvolvimento de materiais inovadores que possibilitem a máxima ação dessas moléculas (Blanco & Nascimento-Júnior, 2017; Coelho, 2020).

A primeira chalcona reportada na literatura com atividade leishmanicida foi a licochalcona A (Figura 10), extraída das raízes da planta *Glycyrrhiza glabra* (*Fabaceae*), conhecida também como alcaçuz chinês. Essa substância apresentou expressivo efeito inibitório sobre o crescimento das formas amastigotas e promastigotas das espécies *Leishmania major* e *Leishmania donovani* (Chen *et al.*, 1994). A ação leishmanicida desta substância ocorreu via inibição de determinadas enzimas essenciais para o metabolismo celular do parasito como a fumarato redutase, provocando alterações estruturais e funcionais nas mitocôndrias do parasito, impedindo assim o seu crescimento (Chen *et al.*, 2001).

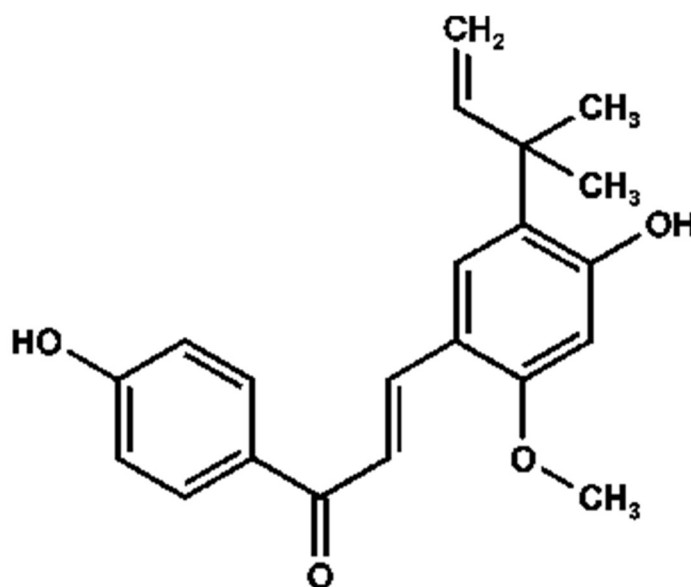


Figura 10 - Estrutura química Licochalcona A (Mandge *et al.*, 2007).

Considerando a facilidade de síntese das chalconas contendo substituintes diversos, a avaliação da atividade leishmanicida deste grupo de moléculas torna-se relevante (Garcia *et al.*, 2021). A síntese de novas estruturas moleculares como protótipos das chalconas possibilita a obtenção de novas substâncias com potencial atividade antileishmania, além da avaliação do possível mecanismo de ação, sendo

importante para o desenvolvimento de uma terapia alternativa no tratamento das leishmanioses (Mendes, 2019).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Todos os ensaios realizados neste trabalho foram desenvolvidos no LHCC/UNEB (Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular da Universidade do Estado da Bahia) e no LETI/FIOCRUZ-BA (Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia) e plataformas da Fundação Oswaldo Cruz/BA.

4.1 MOLÉCULA

O composto E-1-benzo[d][1,3] dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (Figura 11), foi sintetizado pelo Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal da Paraíba, Brasil e gentilmente cedida pelo Dr. Luís Cezar Rodrigues ao nosso grupo de pesquisa.

O processo de síntese do FERAI, iniciou-se através da reação de etilação na bromo-vanilina (1 eq./2,17 mmol) e brometo de etila (1 eq./2,17 mmol) e K_2CO_3 (2 eq./4,34 mmol) como catalisador. A reação foi mantida sob agitação magnética por 24 horas e monitorada por cromatografia analítica em camada fina. Após 24 horas, a reação foi processada por partição em acetato de etila e água, a fase orgânica extraída foi tratada com sulfato de sódio anidro e, em seguida, concentrada sob pressão reduzida. Um pó branco foi obtido com um rendimento aproximado de 89,40% para bromo etil vanilina (Winter *et al.*, 2016).

A última etapa do processo foi à síntese da bromo-chalcona, partindo da reação de etilação de bromo-vanilina. Uma vez obtida, a bromoetilvanilina (1 eq./1,85 mmol) foi submetida a condensação aldólica com 3,4-(metilenodioxo) acetofenona (1 eq./1,85 mmol). O sistema foi deixado sob agitação por 8 horas obtendo-se um precipitado amarelado que foi filtrado, lavado com água e metanol, em seguida seco à temperatura ambiente, obtendo-se um pó amorfo, com rendimento aproximado de 90% (Winter *et al.*, 2016).

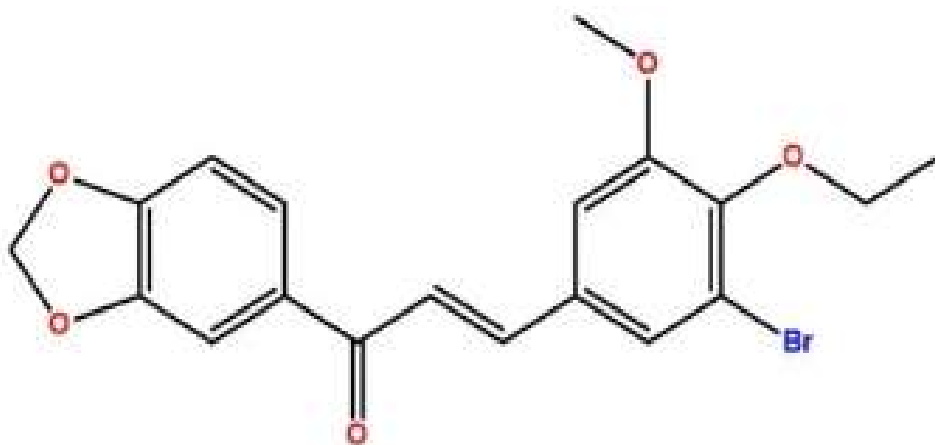


Figura 11 - Estrutura química da chalcona (E)-1-benzo[d][1,3] dioxol-5-il)-3-(3bromo-4-etoxi-5-metoxifenil) prop-2-en-1-ona (FERAI).

4.2 CULTIVO DE MACRÓFAGOS

As células de linhagem J774 oriundas de tumor em camundongos BALB/C foram cultivadas em meio DMEM (Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), suplementadas com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina (FBS, GIBCO, Thermofisher científico, Waltham, MA EUA), 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA). As células J774 foram mantidas em cultura a 37°C e 5% de CO₂. Ao atingirem 80 a 90% de confluência, as células foram retiradas das garrafas de cultura, centrifugadas a 3000 rotações por minuto (RPM) e ressuspensas em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) completo.

4.3 PARASITOS

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma, St. Louis, MO, Estados Unidos) contendo 10% de soro bovino fetal, pH 7,2 e incubados a 26°C. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer, durante cinco dias. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* foram realizadas. A infectividade dos parasitos foi mantida através de passagens em camundongos susceptíveis da linhagem BALB/c.

4.4 TESTE DE CITOTOXICIDADE SOBRE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

A avaliação da atividade do citotóxica do composto foi realizada utilizando macrófagos murinos J774, incubados em placas de 96 poços (1×10^4 células/poço) em meio DMEM, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SIGMA) e 50 µg/mL de gentamicina (GIBCO) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. O composto foi testado em séries de seis concentrações, em triplicatas e incubado por 72 horas. Posteriormente, foram adicionados 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 4 h. A leitura no espectrofotômetro (leitor de microplaca, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, EUA) foi realizada a 570 e 600 nm. Os resultados foram expressos através dos valores da concentração citotóxica de 50% para as células (CC₅₀). Como controle positivo foi utilizada a violeta de genciana (Synth, Brasil) (Meira *et al.*, 2017).

4.5 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^6 por poço) foram cultivadas em meio DMEM, em placa de 96 poços em meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementadas com 10% de soro bovino fetal e 50 µg mL⁻¹ de gentamicina (GIBCO) e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações do FERA1 (50 µM – 3,125 µM diluições 1:2), em triplicatas, incubado por 72 h a 26°C. A anfotericina B foi usada como controle positivo (2 µM), em triplicatas. Posteriormente, foi adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2 horas. A leitura foi realizada no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. O valor de CI₅₀ foi calculado com base no percentual de inibição do crescimento das células comparado aos controles negativos. O cálculo foi obtido através dos valores do logaritmo da concentração, seguidos pelo ajuste da curva de regressão não linear. Os valores obtidos correspondem a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes.

4.6 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS *IN VITRO*

5×10^5 macrófagos murinos J774 foram cultivados em placas de 24 poços com lamínulas redondas adicionado previamente aos poços e infectados com *L.*

braziliensis em fase estacionária, na razão de 10 parasitos por macrófago. Diferentes concentrações da FERAI (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, e 2,5 μ M), foram adicionadas aos poços após lavagem com meio DMEM (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil). A anfotericina B (5 μ M) foi utilizada como controle positivo. Após 24 horas, as células foram fixadas em metanol e coradas por Giemsa (Dinâmica, Química Contemporânea Ltda, SP, Brasil). A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos foram determinados pela contagem de 100 células/ poço.

4.7 AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE SELETIVIDADE

O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre valor de CC₅₀ obtido em macrófagos e o valor de IC₅₀ obtido em promastigotas e amastigotas tratados com o FERAI (Passos *et al.*, 2015).

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^7) foram tratadas com duas concentrações do FERAI (5 e 10 μ M) por 24h a 26°C. Os parasitos foram fixados em solução de glutaraldeído a 2% e em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M por 2h, em temperatura ambiente. Após fixação, as amostras foram marcadas com solução contendo tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, por 1h, em temperatura ambiente. Os parasitos foram colocados em suporte de lamínulas de vidro com poly-L-lysina 0,01%, desidratados com série de etanol (30 a 100%) e submetidos ao ponto crítico (substituição do etanol por CO₂). Em seguida, as amostras foram metalizadas com ouro e observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6390LV.

4.9 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Promastigotas de *L. braziliensis* (3×10^6 /poço) foram tratados com FERAI nas concentrações de 5 e 10 μ M durante 24 horas e incubados a 26°C. Após a incubação, os parasitos foram fixados por 1h à temperatura ambiente com formaldeído a 2% vv e glutaraldeído a 2,5% vv (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, EUA) em tampão cacodilato de sódio (0,1 M, pH 7,2). Após a fixação, os parasitos foram lavados 4 vezes com tampão de cacodilato de sódio 0,1 mM, pH 7,2 e fixados com solução de

1% de tetróxido de ósmio (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA). Os parasitos foram subsequentemente desidratados em concentrações crescentes de acetona (30, 50, 70, 90 e 100%) por 10 minutos em cada etapa e embebidas em resina Polybed 29 (PolyScience família, Warrington, PA, EUA). Secções ultrafinas foram preparadas em um ultramicrotomo (LEICA UC7) e seções foram coletadas em redes de cobre de 300 mesh, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo. As imagens foram coletadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JSM-6390LV.

4.9.1 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE MORTE CELULAR

O potencial do FERAI em induzir apoptose ou necrose foi avaliado através da marcação dos parasitos com Anexina V (BioSource, Camarillo, CA, EUA) e Iodeto de Propídio (PI) (BioSource). Promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^6) foram adicionadas a placas de 24 poços contendo meio Schneider, na presença ou não do FERAI, e incubadas por 48 horas a 26°C. Após esse período, os parasitos foram transferidos para tubos de citometria, lavados duas vezes com 1mL de PBS e centrifugadas a 3000 RPM por 5 minutos, ressuspensas em 100 µL do tampão de ligação da Anexina-V (HEPES/NaOH a 10 mM, pH 7,4; NaCl a 140 mM e CaCl₂ a 2,5 mM) e marcadas com 5 µL de Anexina-V por 15 minutos, na ausência de luz. Em seguida, 400 µL do tampão de ligação da Anexina-V e 10 µL de Iodeto de Propídio foram adicionados. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos). 10.000 eventos foram adquiridos e os dados foram analisados pelo software FlowJo v10.6.1 (Tree Star, Ashland, OR).

4.9.2 ANÁLISE DO POTENCIAL DA MEMBRANA MITOCONDRIAL

Promastigotas de *L. braziliensis* (1×10^6 /poço) foram tratados com 5 e 10 µM do FERAI por 72h. Após o tratamento, os parasitos foram incubados com 10 µg/mL de rodamina 123 (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) por 15 minutos. As células tratadas com 3 µM de metanol por 30 minutos foram utilizadas como controle negativo. A aquisição de dados foi realizada por meio de citômetro de fluxo LSRFortessa (BD, Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, Estados Unidos) 10.000 eventos foram adquiridos e os dados analisados pelo software Flowjo_v10. 6.1 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, EUA).

4.9.3 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

Promastigotas de *L. braziliensis* (2×10^6 por poço) foram cultivadas em placa de 24 poços em meio Schneider, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina e submetidas ao tratamento com diferentes concentrações (5 µM a 30 µM) do FERAI. Os parasitos foram incubados por 4h a 26°C. Em seguida os poços foram lavados três vezes com solução de salina. Posteriormente, 6 µL de H₂DCFDA (diacetato de 2'7'- diclorodihidrofluoresceína) foi adicionado por poço (10mM) (Invitrogen, Eugene, EUA), e mantidos por 30 minutos na ausência da luz. A aquisição dos dados foi realizada no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, EUA) e analisados no programa FlowJo_v10.6.1 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, EUA).

4.9.4 TERAPIA COMBINADA

A terapia combinada foi realizada com intuito de verificar a interação farmacológica entre a combinação de um fármaco já utilizado para o tratamento da leishmaniose e a molécula teste. Diluições seriadas duplas foram realizadas em quadruplicatas nas razões de 1:1 e de 10:1 de FERAI e anfotericina B. Para cada razão um valor de CI₅₀ foi calculado para cada uma das drogas e para a combinação entre elas. As concentrações inibitórias fracionárias foram calculadas pela [CI₅₀ quando em combinação/ CI₅₀ da droga isolada] (Chou & Talalay, 2005; Fivelman *et al.*, 2004; Tallarida, 2000).

5.0 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como média ± EPM (erro padrão da média). Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por regressão não linear a partir da porcentagem de resposta biológica (atividade antileishmania) ou redução no número de células (citotoxicidade). A significância das diferenças entre os grupos foi avaliada utilizando o teste oneway ANOVA e o pós-teste de comparação múltipla Tukey para o grupo de amostras ou análise de variância. As análises foram realizadas no programa GraphPadPrism versão 8.02.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DO FERAI

O valor de CC_{50} do FERAI foi determinado frente a macrófagos da linhagem J774. O FERAI apresentou valor de CC_{50} igual a $66 \pm 0,12 \mu M$, sendo várias vezes menos citotóxico que a anfotericina B, um dos medicamentos de referência no tratamento da leishmaniose ($CC_{50} = 3,6 \pm 0,50 \mu M$) e que a violeta de genciana ($CC_{50} = 0,6 \pm 0,01 \mu M$), uma droga com atividade citotóxica já reconhecida (Tabela 2).

Tabela 1 - Citotoxicidade e atividade do FERAI contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania braziliensis*.

VG= Violeta de Genciana; CC_{50} = concentração citotóxica de 50%; IC_{50} = concentração inibitória de 50%; IS= índice de seletividade. Valores calculados a partir de dois experimentos independentes.

COMPOSTOS	MØ J774 $CC_{50} \pm DP$ (μM)	PROMASTIGOTAS $IC_{50} \pm DP$ (μM)	IS	AMASTIGOTAS $IC_{50} \pm DP$ (μM)	IS
FERAI	$66 \pm 0,12$	$9,75 \pm 1,7$	6,8	$10,13 \pm 1,7$	6,6
Anfo B	$3,6 \pm 0,50$	$0,32 \pm 0,01$	11,25	$00,7 \pm 0,004$	5,14
VG	$0,6 \pm 0,01$	ND	ND	ND	ND

Testes de citotoxicidade são importantes para avaliar a capacidade intrínseca do composto em causar danos às células, com o propósito de encontrar um equilíbrio entre o efeito farmacológico e toxicológico, enfatizando seu potencial terapêutico e sua segurança (Wilson, 2000; Melo *et al.*, 2000; Eisenbrand *et al.*, 2002). Corroborando com os resultados encontrados neste trabalho, autores como Gutteridge *et al.* (2007), relataram a baixa citotoxicidade de chalconas sintéticas derivadas da 2',6'-Dihidroxi-4-metoxichalcona frente a células da linhagem J774. Além disso, uma série de estudos realizados por Chiaradia *et al.*, (2015), avaliou a atividade citotóxica de chalconas derivadas do 3,4- metilenodioxo-benzaldeído, evidenciando que a chalcona que

continha um átomo de bromo na sua estrutura apresentava valores de CC_{50} semelhantes ao do FERAI, sendo menos citotóxico que o Pentostan®, o fármaco de referência contra leishmaniose utilizado neste estudo.

6.2 O FERAI INIBE A PROLIFERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

Após observar que o FERAI apresentava baixa citotoxicidade para células de mamíferos, a avaliação da atividade antileishmania desta molécula frente as formas promastigotas de *L. braziliensis* foi realizada. O FERAI inibiu a proliferação de promastigotas de *L. braziliensis* com valor de IC_{50} de $9,75 \pm 1,7 \mu M$. Essa molécula foi menos potente que a anfotericina B, a qual apresentou o IC_{50} de $0,32 \pm 0,01$. Além disso, em relação ao IS, calculado a partir da razão entre os valores de CC_{50} e CI_{50} e que indica o quanto a molécula é mais seletiva para o parasito do que para célula de mamífero, o FERAI foi 6,8 vezes mais seletivo para parasitos que para macrófagos e a anfotericina B foi cerca de 11 vezes mais seletiva para os parasitos (Tabela 2).

Estudos da relação estrutura-atividade das chalconas permitem deduzir que modificações ou adições nos substituintes são estratégias relevantes para reduzir a toxicidade e aumentar o potencial leishmanicida (Ko *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2003; Gutteridge *et al.*, 2007). A molécula FERAI possui a adição do bromo, o que provavelmente otimizou seus efeitos antileishmania. A literatura já relaciona as substâncias sintéticas bromadas com potencial bioativo e aumento da potência de agentes terapêuticos, embora os mecanismos que expliquem esses resultados ainda não estejam totalmente elucidados. Diversas possibilidades são sugeridas como a elevação da lipofilicidade e permeabilidade através das membranas biológicas ou aumento da meia vida (Jitareanu *et al.*, 2018).

6.3 FERAI INIBE A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania braziliensis*

O modelo experimental de infecção de macrófagos J774 por *L. braziliensis* avaliou o potencial do FERAI em reduzir o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas/macrófagos após 24 horas de tratamento (Figura 11). O

FERAI inibiu o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas/100 células em todas as concentrações testadas. Especialmente na maior concentração (20 μM), esta molécula reduziu em 67% o percentual de células infectadas e em 88% o número de parasitos intracelulares quando comparados ao controle não tratado. Como já esperado, a anfotericina B reduziu a infecção e o número de amastigotas na concentração de 5 μM .

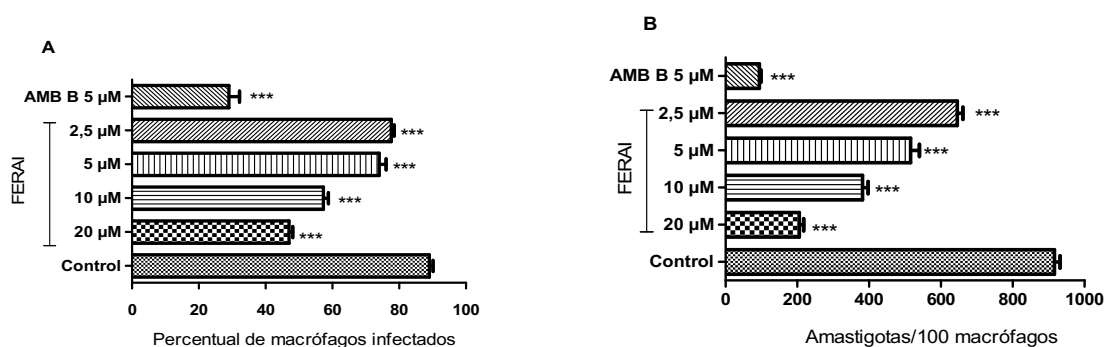


Figura 12 - Efeito do FERA I contra parasitos intracelulares de *L. braziliensis*. Macrófagos foram infectados por *L. braziliensis* (10:1) e tratados com quatro diferentes concentrações do FERA I (2,5 μM a 20 μM) ou anfotericina B (5 μM) por 24h. O percentual de macrófagos infectados (A) e o número de amastigotas por 100 macrófagos (B) foram determinados após 24h de tratamento. Os resultados são representados pela média $\pm$ EPM de três experimentos independentes *** $P < 0,001$.

Em adição a estes dados, o valor de IC_{50} do FERA I para formas amastigotas de *L. braziliensis* foi calculado. O FERA I apresentou IC_{50} de $10,13 \pm 0,05 \mu\text{M}$. Essa molécula foi menos potente que a anfotericina B, a qual apresentou o IC_{50} de $0,07 \pm 0,004$. Além disso, o FERA I foi 6,6 vezes mais seletivo para amastigotas do que para macrófagos, apresentando melhor valor de IS que a anfotericina B ($\text{IS} = 5,14$) (Tabela 2).

Vannier-Santos *et al* (2002), afirmam que células do sistema fagocitário mononuclear como os macrófagos são inicialmente recrutadas nos hospedeiros vertebrados durante a infecção por leishmanias. Nos nossos ensaios, observamos uma redução no percentual de macrófagos infectados por *L. braziliensis* como também no número de parasitos intracelulares após o tratamento com FERA I. De maneira semelhante, Garcia *et al* (2021) demonstraram que chalconas sintéticas podem interagir com seu alvo em macrófagos infectados. Os autores relataram uma diminuição do número amastigotas e promastigotas após o tratamento com as chalconas LC14 1-(4-bromofenil)-3-(3,4-dimetoxifenil)-2-Propen-1-ona, LC32: 1- (2-

Clorofenil)-3-(4-fluorofenil)-2-Propen-1-ona e LC 39 1-(4-Bromofenil)-3-(4-Nitrofenil)-2-Propen-1-ona.

Os resultados aqui apresentados trazem novas perspectivas para o desenvolvimento de fármacos antileishmania tendo as chalconas como princípio ativo, considerando a sua capacidade em reduzir o percentual da infecção quando comparada com as células não tratadas.

7.0 INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO

7.1 ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS NO PARASITO APÓS TRATAMENTO COM FERAI

A análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi usada para avaliar a morfologia de promastigotas *L. braziliensis* tratados ou não com FERAI. Os promastigotas não tratados mantinham a forma alongada e sem alterações (Figura 12A). Parasitos tratados por 48 h com FERAI a 5 μ M apresentaram alterações morfológicas, como perda da forma alongada, abaulamento e retração do corpo celular (Figura 12B). Promastigotas tratados com FERAI a 10 μ M apresentam lise da membrana plasmática e extravasamento de conteúdo (Figura 12C).

Na microscopia eletrônica de transmissão (MET), os parasitos não tratados apresentavam morfologia típica com a mitocôndria, núcleo, cinetoplasto, bolsa flagelar e flagelo bem preservados (Figura 12D). Os promastigotas submetidos ao tratamento com FERAI a 5 μ M apresentavam acúmulo de inclusões lipídicas intracitoplasmáticas e tumefação nuclear (Figura 12E). Quando tratadas a 10 μ M, os promastigotas apresentavam desorganização do citoplasma, especialmente na morfologia mitocondrial e nuclear, além de perda flagelar (Figura 12F).

De Mello *et al* (2016) investigaram alterações ultraestruturais e morfológicas em promastigotas de *L. braziliensis* após tratamento com chalconas sintéticas. Os autores observaram a perda da morfologia celular com encolhimento e deformação do corpo celular, bem como a desorganização completa do citoplasma, corroborando com os resultados encontrados neste trabalho

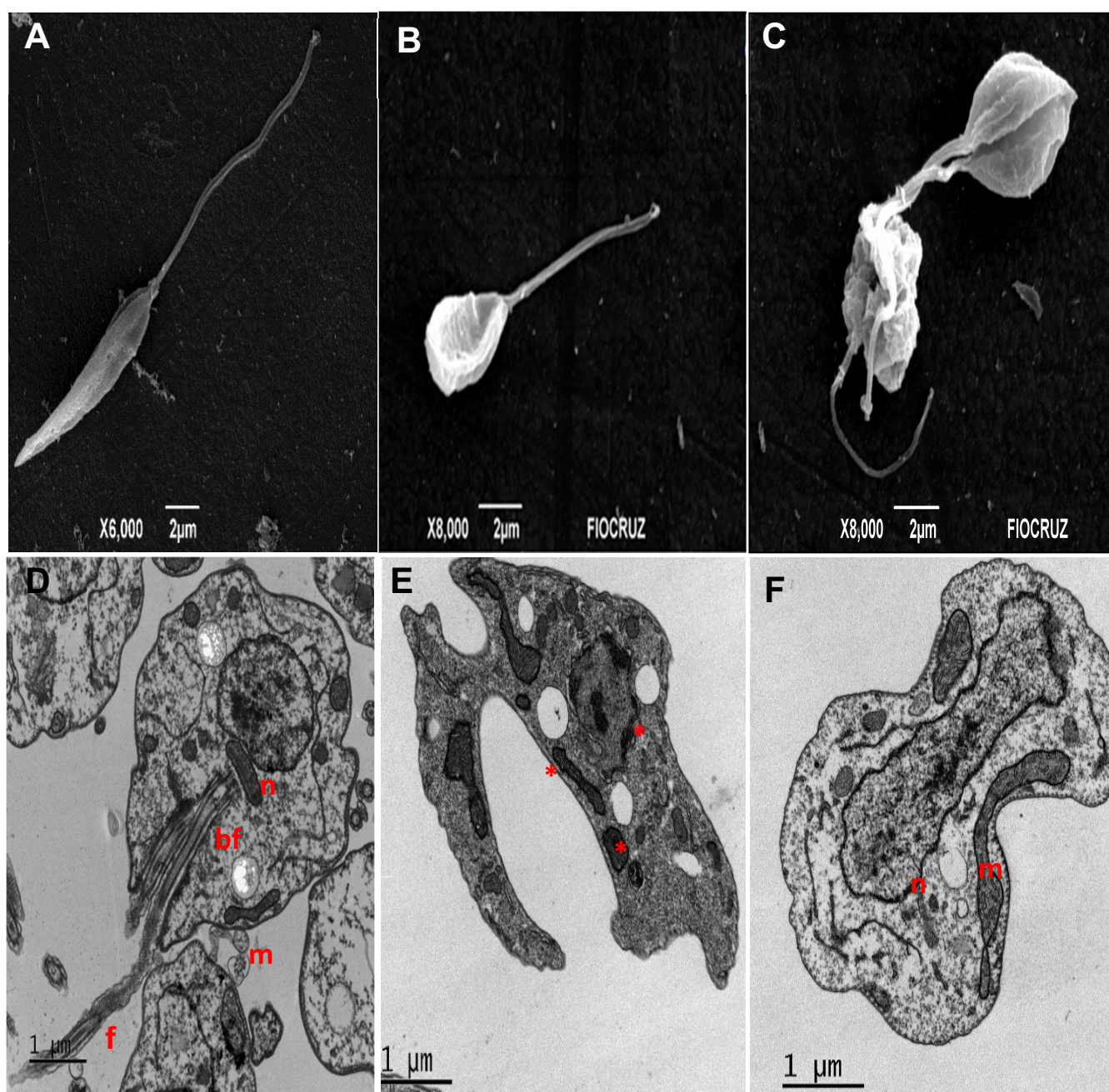


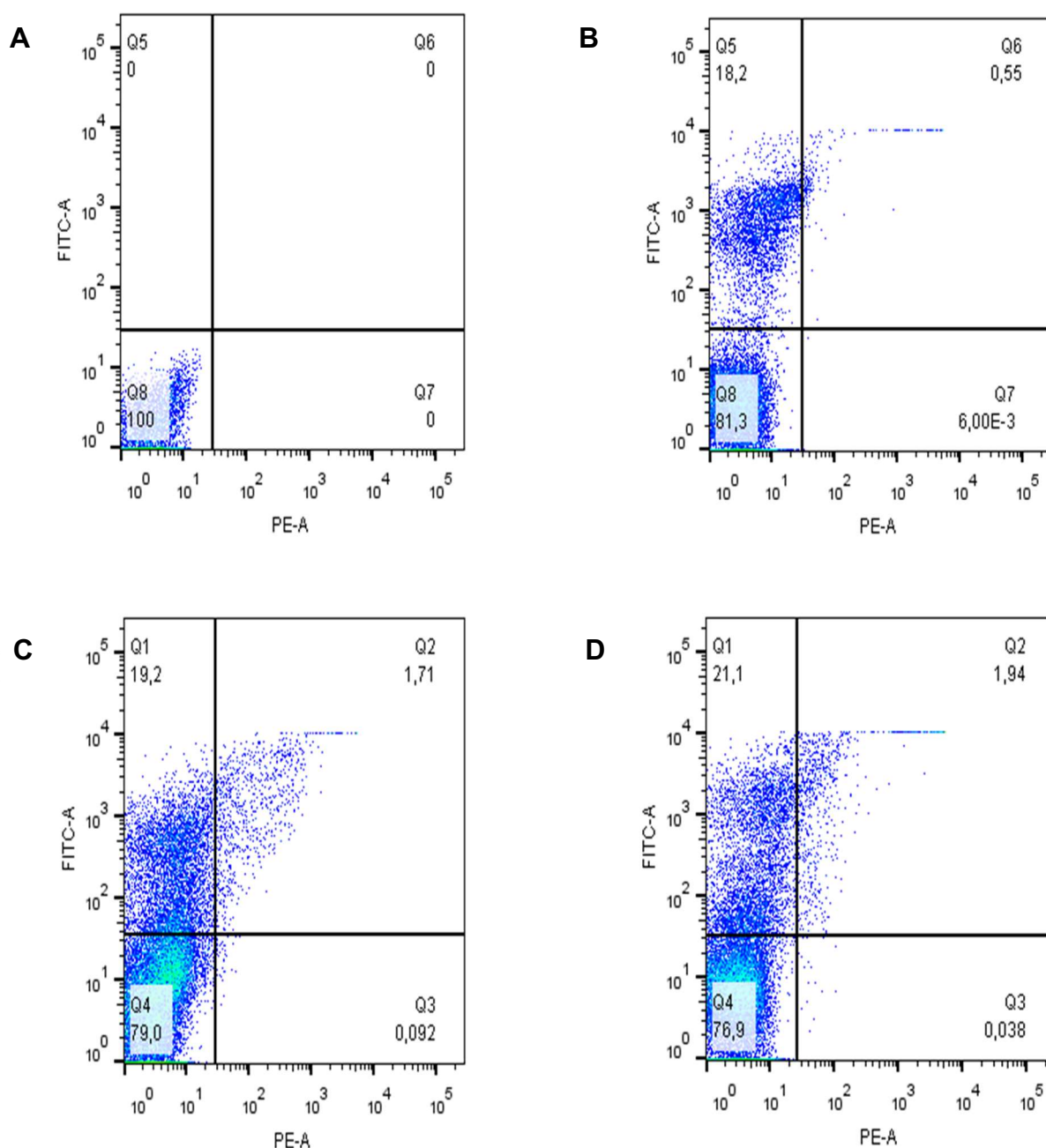
Figura 13 - Alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* após o tratamento com FERAI. Microscopia eletrônica de varredura. (12A, 12B e 12C) e Microscopia eletrônica de transmissão (12D, 12E e 12F) Promastigotas de *L. braziliensis* não tratados (12 A e 12 D), tratados com 5 μ M (12 B e 12D) e com 10 μ M de FERAI (12 C e 12 F). Flagelo (f). Bolsa flagelar (bf). Mitocôndria (m). Cinetoplasto (k). Núcleo (n). (Seta vermelha) Vacúolos lipídios.

7.2 FERAI INDUZ APOPTOSE EM PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

Para avaliar o mecanismo pelo qual o FERAI poderia causar a morte do parasito, promastigotas foram corados com anexina-V e iodeto de propídio (PI) e

analisadas por citometria de fluxo. As análises demonstraram que a apoptose, um processo de destruição celular altamente programado e controlado, caracterizado pelas mudanças bioquímicas e alterações morfológicas, foi o mecanismo de morte celular desencadeado pelo FERAI em promastigotas de *L. braziliensis*. Os parasitos não tratados com FERAI foram anexina-V e PI negativos, demonstrando a viabilidade celular (Figura 13A). Assim como a anfotericina B, o tratamento de promastigotas com diferentes concentrações de FERAI direcionou à morte celular por apoptose (marcação positiva para anexina-V) (Figura 13B, C, D).

Células viáveis com membranas íntegras excluem o PI, onde apenas as membranas de células mortas e danificadas são permeáveis a este marcador (morte por necrose). Em células apoptóticas, a fosfatidilserina é translocada do folheto interno para o externo da membrana plasmática e a anexina-V se liga à fosfatidilserina exposta (BASMACIYAN *et al.*, 2019). A apoptose é crucial no contexto da resposta imune do hospedeiro e relevante para o desenvolvimento da homeostase dos tecidos em organismos multicelulares. Em tripanossomatídeos, a morte celular programada mostra-se vantajosa para prevenir o estabelecimento bem-sucedido da infecção, uma vez que sua sobrevivência no interior do macrófago é necessária para patogênese da doença no hospedeiro mamífero (Aliança *et al.*, 2017; Baréa *et al.*, 2018). Paralelamente, este fenótipo permite regular a densidade celular do parasito no hospedeiro evitando o hiperparasitismo (Basmaciyan *et al.*, 2019).



PI

Figura 14 - Padrão de morte celular por citometria de fluxo. Promastigotas de *L. braziliensis* foram tratadas com FERAI e incubadas com iodeto de Propídio e Anexina V. (A) Promastigotas não tratadas; (B) promastigotas tratadas com 3 μM de AMB; (C) promastigotas tratadas com 5 μM de FERAI; (D) promastigotas tratadas com 10 μM de FERAI. Valores representativos de dois experimentos realizados.

7.3 FERAI ALTERA POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCÔNDRIAL ($\Delta\Psi\text{M}$)

A fim de melhor elucidar as vias que levam à morte celular por apoptose, o potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. braziliensis* foi avaliado

por citometria de fluxo, após o tratamento com 5 e 10 μM de FERAI e incubação com rodamina123. A intensidade da rodamina123 foi significativamente reduzida após a incubação dos parasitos com o composto quando comparados ao grupo tratado com o metanol, o controle positivo para despolarização. FERAI causou alteração do potencial de membrana mitocondrial das formas promastigotas em ambas as concentrações testadas, em 63,9% quando tratadas com 5 μM e em 77,6 % quando tratadas a 10 μM , sugerindo uma possível associação direta do composto sobre essa via.

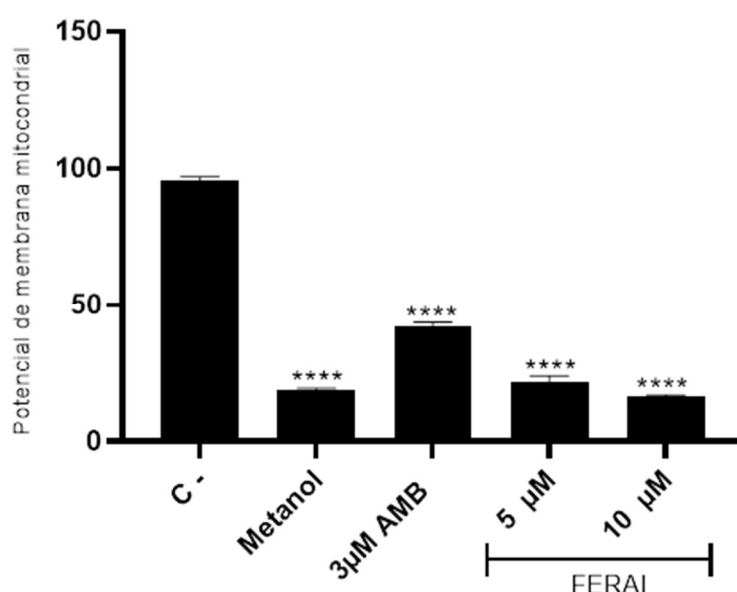


Figura 15 - Potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. braziliensis* após tratamento com o FERAI. Os parasitos foram incubados e tratados com o composto (nas concentrações 5 μM e 10 μM). Após 72h de incubação, os parasitos foram marcados com rodamina 123. O metanol foi utilizado como o controle positivo. As amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo LSRFortessa e analisadas pelo software FlowJo (10.000 eventos foram coletados e analisados).

Os parasitos do gênero *Leishmania* têm como característica especial a presença de uma grande e única mitocôndria, que é responsável pela maior parte do suprimento de energia, desempenhando assim um papel essencial para sobrevivência do parasito. Alterações na morfologia e na função mitocondrial é um dos principais fatores que levam a perda da viabilidade nestas espécies de parasito (Ledezma *et al.*, 2002). Por este motivo, esta organela tornou-se um potencial alvo para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (De Souza *et al.*, 2009; Jelk *et al.*, 2019). Além disso, transtornos mitocondriais produzidos por alterações no potencial

da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) podem ser vistas como uma das consequências da apoptose ou ainda, como um requisito inicial para que esta ocorra (Gottlieb *et al.*, 2003; Jelk *et al.*, 2019).

O estudo realizado por Assolini *et al* (2020) avaliou o efeito da chalcona sintética 4-nitrochalconas contra *L. amazonensis* e, corroborando com o nosso trabalho, os autores observaram uma diminuição do potencial transmembrânico mitocondrial. Em outro estudo, De Mello *et al* (2016) demonstraram que derivados de chalconas também alteram a permeabilidade de membrana mitocondrial de promastigotas de *L. braziliensis* e aumentam a geração de espécies reativas de oxigênio, direcionando para a morte celular por apoptose (Zhu *et al.*, 2019).

7.4 FERAI ALTERA A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO EM PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

Os níveis de ROS foram mensurados a fim de investigar se o efeito leishmanicida do FERAI se deve a produção ROS em promastigotas de *L. braziliensis*. O FERAI induziu a produção concentração dependente de ROS nas concentrações de 10 μ M (56,33%) e 20 μ M (61,76%) em comparação com o controle não tratado (Figura 13).

Para a detecção de espécies reativas de oxigênio, a sonda H₂DCFDA não fluorescente e permeável às células foi utilizada. Esta sonda, quando oxidada no citosol, é desesterificada intracelularmente transformando-se em um composto altamente fluorescente (2',7'- diclorofluoresceína) (Zorova *et al.*, 2018). O aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) é um fator limitante para sobrevivência da leishmania no interior do vacúolo parasitóforo (Antinarelli *et al.*, 2015; Shadab *et al.*, 2017; Smirlis *et al.*, 2010). Algumas chalconas desencadeiam a apoptose e este mecanismo de morte celular sucede a produção de ROS desencadeado por diversos fatores. O estresse celular causado pela presença de substâncias, por exemplo, pode motivar a abertura de canais mitocondriais e desencadear um colapso na membrana mitocondrial do parasito (Zorov *et al.*, 2006; Zorova *et al.*, 2018).

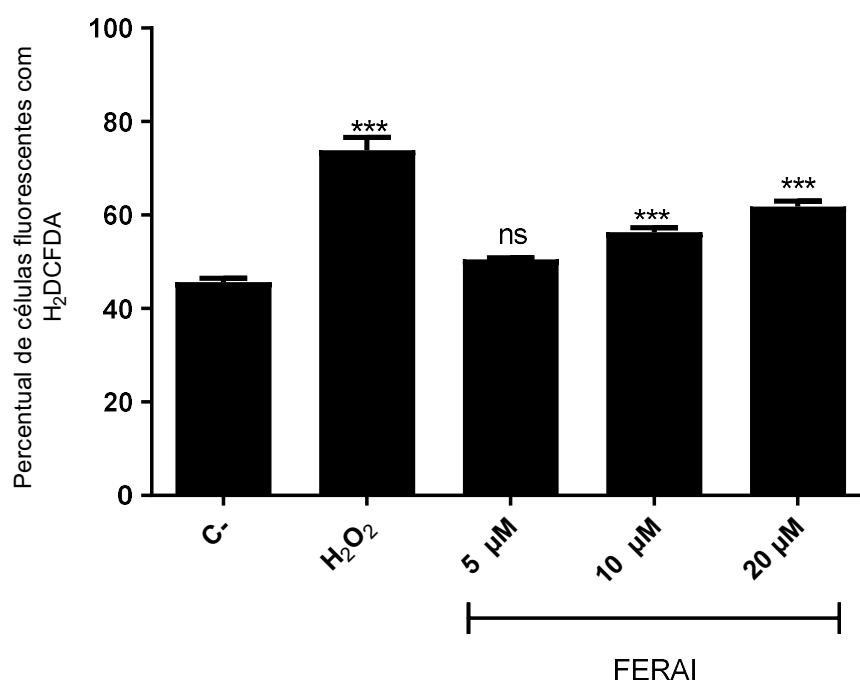


Figura 16 - Avaliação dos níveis intracelulares de ROS em promastigotas de *L. braziliensis* induzida por FERAI em diferentes concentrações (5, 10 e 20 µM) por 48 horas e incubadas com sonda H₂DCFDA por 30 minutos. *** $P < 0,001$ e ns= não significativo em comparação ao controle não tratado.

7.5 EFEITO SINÉRGICO DO FERAI E ANFOTERICINA B

A associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação já é utilizada para evitar a resistência em infecções no tratamento de diversas doenças. Esse tipo de terapia tem se mostrado uma tendência atual, visando principalmente aumentar a eficácia do tratamento (Lima *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que fármacos antileishmania, quando combinados, são capazes de diminuir a dose necessária dos medicamentos, o tempo de administração e consequentemente a toxicidade, podendo contribuir para melhorar a adesão ao tratamento e diminuir as falhas terapêuticas (Al-Mutairi *et al.*, 2009; Corral *et al.*, 2014; El-Sayed; Anwar, 2010; Moraes-Teixeira *et al.*, 2015).

O efeito antileishmania da combinação do FERAI com a anfotericina B foi investigado sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*. Em comparação com a droga isolada, a combinação de FERAI e anfotericina B reduziu os valores de IC₅₀ da anfotericina cerca de 3 vezes e do FERAI aproximadamente 8,5 vezes (Tabela 3). A análise do efeito combinatório foi realizada por meio da determinação da Concentração Inibitória Fracionada (FIC), utilizado como ponto de corte para

determinar o sinergismo, através do método de Chou-Talalay (CI) baseado na utilização de concentrações das inibitórias mínimas encontradas na terapia individual e combinada (Chou, 2010).

Os valores do índice de combinações associados revelaram que FERAI e anfotericina B têm efeitos sinérgicos. O sinergismo, assim como o efeito aditivo da combinação de fármacos têm como vantagem aumentar ou manter eficácia do efeito terapêutico com a redução da dosagem do fármaco, minimizando dessa forma a toxicidade e o desenvolvimento de resistência aos fármacos (Cho,2010).

Tabela 2 - Redução da concentração e índice de combinação por FERAI e anfotericina B. Os valores de CI_{50} foram calculados usando concentrações em quadruplicatas e dois experimentos independentes foram realizados; ** Índice de combinação (IC). Corte: IC valor de 0,1–0,7, sinergismo; 0,7–0,85, sinergismo moderado; 0,85–0,9, ligeiro sinergismo; 0,9–1,1, aditividade; > 1,1, antagonismo. DP= Desvio Padrão.

Compostos	$CI_{50} \pm DP (\mu M)^*$		
	Droga isolada	Combinação	IC**
FERAI	$9,21 \pm 0,17 \mu M$	$0,08 \pm 0,01 \mu M$	$0,20 \pm 0,21$
Anfotericina B	$0,05 \pm 0,66 \mu M$	$0,013 \pm 0,05 \mu M$	

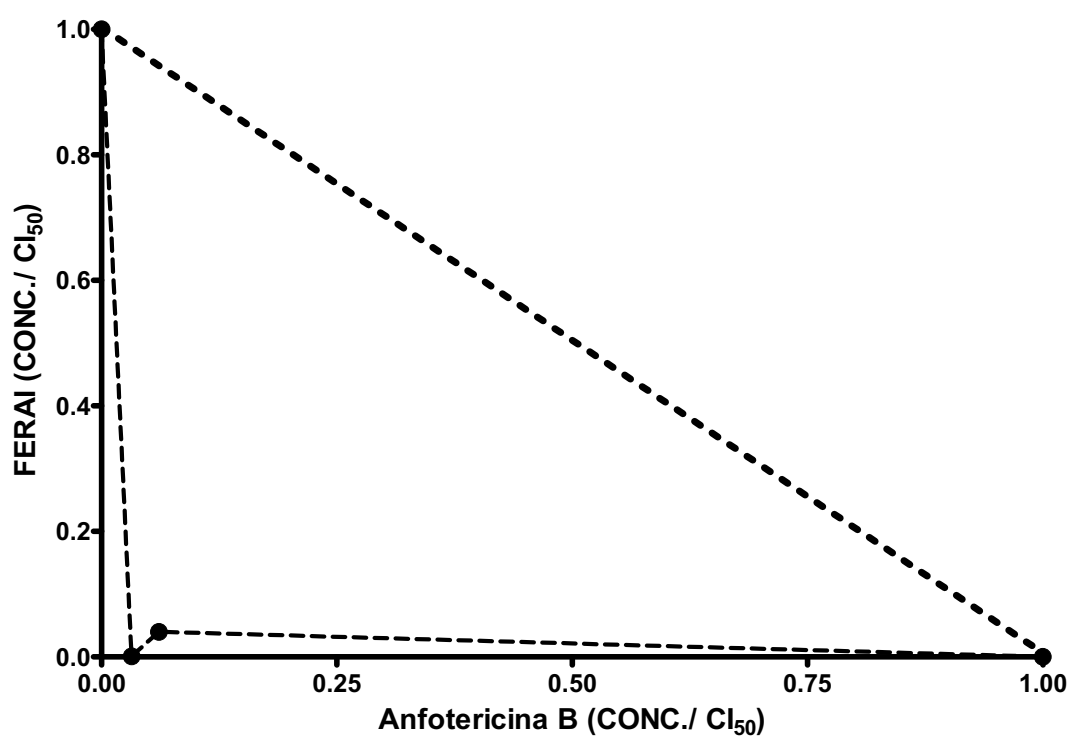


Figura 17 - Isobolograma descrevendo os efeitos de sinergismo entre FERAI e anfotericina B sobre promastigotas de *L. braziliensis*. As linhas pontilhadas correspondem as posições previstas dos pontos experimentais para efeitos aditivos.

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, este trabalho mostrou que o FERAI tem ação *in vitro* antileishmania direta, segura e eficaz, afetando vias bioquímicas e organelas importantes no parasito como a membrana, a mitocôndria e o núcleo. Além disso em combinação com a anfotericina B, esta chalcona foi capaz de potencializar seu efeito a partir de uma interação sinérgica com a droga de referência. Sugere-se, portanto, que o FERAI pode ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento da leishmaniose.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, M. M. S. “Estudos sobre *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis*: hábitos alimentares, infecção natural por *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* chagasi e correlação com a expansão da leishmaniose visceral americana”. **Tese** (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública)-Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2013.
- ALATAŞ, Ö.; KAPLANCICLI, Z. A. Synthesis and Evaluation of New Indole-Based Chalcones as Potential Antiinflammatory Agents. **European Journal of Medicinal Chemistry** v.89, p.304,2015.
- ALIANÇA, ASDS, OLIVEIRA, AR, FEITOSA, APS, RIBEIRO, KRC, DE CASTRO, M. CAB, LEITE, ACL, et al. (2017).Avaliação *in vitro* da Citotoxicidade e Atividade Leishmanicida de Derivados Ftalimido-Tiazólicos.EUR. **J. Pharm. Ciência**105,p.1–10. doi:10.1016/j.ejps.2017.05.005.
- AL-MUTAIRI, N; ALSHILTAWY, M; EL KHALAWANY, M; JOSHI, A; EASSA, B. I; MANCHANDA, Y; GOMAA, S; DARWISH, I AND RIJHWANI, M. Treatment of old world cutaneous leishmaniasis with dapson, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. *International Journal of Dermatology*, v. 48, n. 8, p. 862–869, 2009.
- ANDERSON,C.F.; STUMHOFER, J.S.; HUNTER,C.A.; SACKS, D. **IL-27 regula IL-10 e IL-17 de células CD4+ em não cicatrização *Leishmania major*** *J Immunol*, 2009, p.46 69–27.
- ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- ANDRADE, B. B. et al. Métodos diagnósticos da Leishmaniose Tegumentar: fatos, falácias e perspectivas. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 75, n. 1, p. 75-82, 2005.
- ARCE-FONSECA M, Rios-Castro M, CarrilloSánchez SC, Martinez-Cruz M, RodríguezMorales O. Prophylactic and therapeutic DNA vaccines against Chagas disease. **Parasit Vec - tors** 2015; 8:121.
- ASSOLINI, Joao Paulo et al. 4-nitrochalcone exerts leishmanicidal effect on *L. amazonensis* promastigotes and intracellular amastigotes, and the 4-nitrochalcone encapsulation in beeswax copaiba oil nanoparticles reduces macrophages cytotoxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 884, p. 173392, 2020.
- BARÉA, P., BARBOSA, VA, BIDÓIA, DL, DE PAULA, JC, STEFANELLO, TF, DA COSTA, W. F., Estudos de Síntese, Atividade Antileishmania e Mecanismo de Ação de Novos Híbridos de β -carbolina-1,3,5-triazina.**J. Med. Chem.**p.579–590,2018. Doi :10.1016/j.ejmech.2018.03.014.
- BARROSO G.N. **Efeito tripanocida *in silico* e *in vitro* de p-aminochalconas sintéticas**. Universidade Federal do Ceará,2003.

BASTOS M. M.; BÔAS L. V.; BOECHAT N.; OLIVEIRA A. P. Quimioterapia Antileishmanial: **Uma Revisão da Literatura. Revista Virtual de Química**, v.8, n. 6,p. 2072-2104, 2016.

BOAVENTURA, V.S.; SANTOS, C.S.; CARDOSO, C.R.; DE ANDRADE. J.;DOS SANTOS. W.L.C.;CLARÊNCIO J.Leishmaniose mucosa humana: neutrófilos infiltram áreas de dano tecidual que expressam altos níveis de citocinas relacionadas a Th17.**Eur J Immunol** 2010.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment.Clin. **Infect Dis.**, 2005; 7:33 –38.

BRASIL, A. RDC. Resolução de diretoria colegiada - RDC nº 337, de 11 de fevereiro de 2020 de 11 de fevereiro de 2020 - **DOU - Imprensa Nacional**. 11 fev. 2020.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2017.

_____. **Secretaria de Vigilância em Saúde Boletim Epidemiológica** Ministério daSaúde Brasília 2021.

_____. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Farmacopeia Brasileira, volume 2. 5ª Ed. Ministério da Saúde, Brasília, 2019.

_____. Doenças Tropicais Negligenciadas. **Boletim Epidemiológico Brasília**, v.19 especial. 2021. Disponível em: boletim_especial_doencas_negligenciadas.pdf (www.gov.br) Acesso em: 12 jul 2022.

CASTILHO,M.;GOLDSMITH-PESTANA,K;LOZANO,C ; VALDERRAMA, L.; SARAVIA, N.G.;MCMAHON-PRATT,D.; Modelo murino de crônicaL. (Viannia) panamensis infecção: papel da IL-13 na doença. **Eur J Immunol**, 2010, p.2816.

CATALDO JI, et al. Favorable responses to treatment with 5 mg Sbv/kg/day meglumine antimoniate in patients with American tegumentary leishmaniasis acquired in different Brazilian regions. **Rev Soc Bras Med Trop**,2018;51 (6):769-780.

CECÍLIO, P. et al. Deception and manipulation: the arms of Leishmania, a successful parasite. **Front. in Immun.** v. 5, n. 484.0, p. 1-16, 2014.

CHAKRAVARTY, J., SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**, vol. 20, no. 10, p.1251–1265, 2019. <https://doi.org/10.1080/14656566.2019.1609940>.

CHOU T.C. Drug combination studies and their synergy quantification using the choutalalay method. **Cancer Res.** 2010; 70:440-446.

COELHO A.C.Papel do transportador ABC PRP1 na resistência a pentamidina em Leishmania ssp. **Tese de mestrado**, Universidade de São Paulo, 2022.

CORRAL, M. J; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, E; CUQUERELLA, M; ALUNDAET, J. M. *In vitro* synergistic effect of amphotericin B and allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1596–1602, 2014.

DAVIDSON, R. N.; DEN BOER, M.; RITMEIJER, K. Paromomycin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 103, n. 7, p. 653–660, 2009.

DE MELLO, Marcos Vinícius Palmeira et al. A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920-929, 2018.

COELHO A.C. Papel do transportador ABC PRP1 na resistência a pentamidina em *Leishmania* ssp. **Tese de mestrado**. Universidade de São Paulo, 2008.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 1 nov. 2012.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: A comparative study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 3, p. 335–340, 2010.

HUSSAIN I.; ALI, A.; Phytochemistry International. **Journal of Plant Chemistry Plant Biochemistry and Molecular Biology**, 2017, p.104.

LIMA, E. B; MOTTA, J. O. C; POTO, C; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n.2, p. 111–124, 2007.

YANSC, et al. Reduction of pentavalent antimony by trypanothione and formation of a binary and ternary complex of antimony(III) and trypanothione. **J. Biol. Inorg. Chem**, 2003; 8:689-697.

CHIARAVALLOTI N. F. **O geoprocessamento e saúde pública**. Arq Ciênc da Saúde, v. 23, n. 4, p. 01-08, 2017.

CHIARADIA D.L. Obtenção de chalconas sintéticas com potencial atividade biológica. **Tese de mestrado**. Química da Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

COSTA, S.; RANGEL, E. Environmental suitability for *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) and the occurrence of American cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Parasit Vectors**, v. 11, n. 4, p. 149-155, 2018.

DIAS, D. S. et al. Recombinant small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein of *Leishmania infantum*: Potential vaccine and diagnostic application against visceral leishmaniasis. **Molecular Immunology**, v. 91, n. p. 272–281, 2017.

DOMINGUEZ F. R.M. Ligantes multialvos-dirigidos como estratégia no combate à leishmaniose. síntese de derivados híbridos triazina-chalconas. **Tese de Mestrado**. Instituto de química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2022.

DORLO, T. P. C. et al. Miltefosine: A Review of Its Pharmacology and Therapeutic Efficacy in the Treatment of Leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–2597, 1 nov. 2012.

EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, B. J., BOOBIS, Methods of in vitro toxicology. **Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

GALLUZZI, L., VITALE, I., ABRAMS, J. M., ALNEMRI, E. S., BAEHRECKE, E. H., BLAGOSKLONNY, M. V., DAWSON, T. M., DAWSON, V. L., EL-DEIRY, W. S., FULDA, S., GOTTLIEB, E. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation** 19: 107– 120, 2012.

GOMES, A. et al. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human Leishmania (Viannia) braziliensis infection? **Clinical and experimental immunology**, v. 149, n. 3, p. 440–4, 2007.

GONTIJO, B.; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

GOTO H., LINDOSO J.A. Current diagnosis and Treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmania. **Expert Ver Anti Infect Ther** p.419-433, 2010.

GOTTLIEB, E. et al. Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 6, p. 709-717, jun. 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401231>.

GUTTERIDGE, C.E.; VO, J.V.; TILLET, C.B.; VIGILANTE, J.A.; DETTMER, J.R.; PATTERSON, S.L.; WERBOVETZ, K.A.; CAPERS, J.; NICHOLS, D.A.; BHATTACHARJEE, A.K.; GERENA, L. Antileishmanial and antimalarial chalcones: Synthesis, efficacy and cytotoxicity of pyridinyl and naphthalenyl analogs. **Medicinal Chemistry**, v. 3, p. 115-119, 2007.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug Discovery. **Parasitology Research** 2019.

JAIN K.; JAIN N.K. Vaccines for visceral leishmaniasis: a review. **J Immunol Methods** 2015.

JELK, J. et al. Anti-parasitic dinuclear thiolato-bridged arene ruthenium complexes alter the mitochondrial ultrastructure and membrane potential in Trypanosoma brucei bloodstream forms. **Experimental Parasitology**, v. 205, p. 107753, out. 2019.

JUNIOR G.S.O. Indicadores epidemiológicos da leishmaniose tegumentar americana

no estado do Tocantins no período de 2001 a 2018. **Revista de Patologia do Tocantins**, 2012.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Review Microbiology**. Vol. 9, pag. 604-15, 2011

LABANA, S.; PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Chemotherapeutic activity against murine tuberculosis of once weekly administered drugs (isoniazid and rifampicin) encapsulated in liposomes. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 20, p.301,2002.

LAMOTTE, S. et al. Discovery of Novel Hit Compounds with Broad Activity against Visceral and Cutaneous Leishmania Species by Comparative Phenotypic Screening. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 438, 2019.

LEDEZMA, E. et al. Antiproliferative and leishmanicidal effect of ajoene on various Leishmania species: ultrastructural study. **Parasitology Research**, v. 88, n. 8, p. 748-753, 1 ago. 2002.

LUCIA, R.N.B.P. **Distribuição espaço temporal dos casos humanos de leishmaniose tegumentar americana notificados no estado do rio de janeiro de 2001 a 2013 e associação com variáveis clínicas e populacionais**. Ministério da Saúde. 2016, Rio de Janeiro.

LIMA J.D.S. Inflammasome-derived IL-1 β Production Induces Nitric Oxide-mediated Resistance to Leishmania. **Nature Medicine**, v. 19, p. 909-915, 2017.

LIMA, D. A. et al. Aspectos epidemiológicos, sociais e ambientais relacionados a transmissão e ao controle da leishmaniose visceral canina na Ilha da Marambaia, Mangaratiba–Rio de Janeiro. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, n. 3, p. 64–81, 2019.

LIMA E.B, PORTO C., MOTTA J.C.O, SAMPAIO R.N.R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **An. Bras. Dermatol.** v 82:p 11 2018.

LOPEZ, A.; M.S.;MORALES,R.;CABRERA,M.;ARIAS,A. **Med.Veterinario**. v.33, 1p.45- 153,2001.

KEVRIC I.;CAPPEL MA AND KEELING JH.New World Leishmania Infections: A Practical. **Review.Dermatol clinic**. v33, 2015, p.579-593.

KIP, A. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **ClinPharmacokinet**. v.57, p.151–176, 2018.

Kozlowski D, Trouillas P, Calliste C, Marsal P, Lazzaroni R, Duroux JL. Density functional theory study of the conformational, electronic, and antioxidant properties of natural chalcones. **J Phys Chem A**. 2007 Feb 15; Epub 2007 Jan 25.

MARTENS, S.; MITHOFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, v. 66 p. 2399,2005.

MELO, P. S., MARIA, S. S., VIDAL, B. C., HAUN, M., DURAN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 36, n. 8, p. 539-543, 2000.

MARQUES C. D. E. Estratégias terapêuticas disponíveis no Brasil para tratamento da leishmaniose visceral: formulações farmacêuticas. **Tese de mestrado**. Universidade Federal de Ouro Preto, 2019.

MONGE-MAILLO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis: drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, n. 9, p. 1398–1404, 2015.

MOAFI M.; REZVAN H.; SHERKAT R.; TALEBAN R. Leishmania vaccines entered in clinical trials: a review of literature. **Int J Prev Med** 2019.

MOHAMAD, A. S.; AKHTAR, M. N.; ZAKARIA, Z. A.; PERIMAL, E. K.; KHALID, S.; MOHD, P.A.; KHALID, M. H.; ISRAF, D. A.; LAJIS, N. H.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of a synthetic chalcone, flavokawin B on chemical and thermal models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology** p. 647, 2010.

MONGE-MAILLO B, LÓPEZ-VÉLEZ R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. v. 73, **Drugs**. 2013.

MORAIS-TEIXEIRA, E; AGUIAR, M. G; LIMA, B. S.S; FERREIRA, L. A. M AND RABELLO, A. Combined suboptimal schedules of topical paromomycin, meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 3283–3290, 2015.

NASSAR, E. M.; ABDELRAZEK, F. M.; AYYAD, R. R.; EL-FARARGY, A. F. Synthesis and Some Reactions of 1-aryl-4-acetyl-5-methyl-1,2,3-triazole Derivatives with Anticonvulsant Activity. **Mini reviews in medicinal chemistry** v.16 p. 926, 2016.

NIELSEN, S. F.; BOESEN, T.; LARSEN, M.; SCHONNING, K.; KROMANN, H. Antibacterial chalcones – bioisosteric replacement of the 4'-hydroxy group. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 3047-3054, 2004.

OLIVEIRA, A.; PAIVA, B.M.; JOSÉ, A.; GOMES, B.S.; NUNES, T.B.; SANTOS.; VARELA, A. P. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana no estado do Pará, Brasil, entre 2008 e 2017. **Rev Pan. Saúde** vol.11 2013.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento. Washington, **D.C.: OPS**, 2017. p. 2379–2387, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. 2012 In: Control of Leishmaniasis. Geneva: World Health Organization. Disponível em https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949 > Acesso

em: 16 de jun 2023.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**. Diminuindo diferenças: a prática das políticas sobre determinantes sociais da saúde: documento de discussão. Rio de Janeiro:2021

_____. 2016. **Control of the leishmaniasis**: report of a meeting of the who expert committee on the control of leishmaniases. Geneva, 2010. Disponível em:<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44412/WHO_TRS_949_eng.pdf?sequence=1>. Acesso em 13 de junho de 2022.

_____. **Leishmaniasis**: Epidemiological Report of the Americas. Leishmaniasis report, 2019.

_____. **Declaração Política do Rio sobre Determinantes Sociais da Saúde**. Rio de Janeiro: WHO; 2019.

ÖZDEMİR, A.; ALTINTOP, M. D.; TURAN-ZITOUNI, G.; ÇİFTÇİ, G. A.; ERTORUN, I.; PALATNIK-DE-SOUSA CB, NICO D. The delay in the licensing of protozoal accines: a comparative history. **Front Immunol**, 2020.

PONTE SUCRE A. et al. The Drug and Vaccine Landscape for Neglected Diseases (2000- 11): A Systematic Assessment. **The Lancet Global Health**, v. 1, n. 6, p. e371–e379, 1 dez. 2013.

QUEIROZ C.M. Avaliação da atividade in vitro de novos compostos heterocíclicos frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum*. **Tese doutorado** - Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade Federal de Pernambuco, 2019.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. Cap. 54, p. 851-856.

RATH S.; TRIVELIN L. A.; IMBRUNITO T.R.; TOMAZELA D.M.; MARCEL N.J.; MARZAL P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova** v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

ROATT, B.; DE OLIVEIRA, J. DE BRITO, R. et al. Recent advances and new strategies on leishmaniasis treatment. **Appl Microbiol Biotechnol.**; v. 104, p. 8965-8977 n., 2020.

ROMERO, A. H.; LOPEZ, S. E. In silico molecular docking studies of new potential 4-phthalazinyldrazones on selected Trypanosoma cruzi and Leishmania enzyme targets. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 76, p. 313-329, 2017.

SAMPAIO R.N.R.; FARIA E.M.; SAMPAIO J.H.D.; FERREIRA F. L.C.; MARSDEN P.D. Morte súbita causada por glucantime. **Ass. Bras Dermatol.** p.63-65, 2017.

SANTAREM, A. A. A. et al. Effectiveness of Miltefosine-Pentoxifylline Compared to Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in C57Bl/6 Mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 517–520, ago. 2014.

SANTIAGO R. R.; HOLANDA S. K. G.; B, SANTOS D.N.; GENRE J.; FRIETAS O L.; SILVA A. L.; MARCELINO H. R.; GONDIME D. A.; TABOSA E. E. S. Nanostructured lipid carriers containing Amphotericin B: Development, in vitro release assay, and 82 storage stability. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, vol 48, p.372–382, 2018.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 18 jun. 2017.

SERENO, D., & LEMESRE, J. L. Axenically cultured amastigote forms as an *in vitro* model for investigation of antileishmanial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p.972-976.2017.

SILVA, S. C. “Estudo comparativo de cepas de *Leishmania Infantum* – Avaliação da susceptibilidade a antimoniais e da expressão de micrornas em macrófagos J774.A1 e camundongos Balb/c experimentalmente infectados”. 2017. 82f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal de Rio Preto, Minas Gerais, 2017.

SOTO J. et al. Miltefosine Combined with Intralesional Pentamidine for *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis in Bolivia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 99 p. 1153-1155,2018.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert opinion on pharmacotherapy**. v. 16, n. 2, p. 237–252, 2015.

TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **MiniReviews in Medicinal Chemistry**, v.18, p.26-41, 2018.

VAKIL, N. H.; FUJINAMI, N.; SHAH, P. J. Pharmacotherapy for Leishmaniasis in the United States: Focus on Miltefosine. Pharmacotherapy: **The Journal of Human Pharmacology and Drug Therapy**, v. 35, n. 5, p. 536–545, 2015.

VANANGAMUDI, G.; SUBRAMANIAN, M.; THIRUNARAYANAN, G. SYNTHESIS. Spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3- thienyl chalcones. **Arabian Journal of Chemistry** v.10, p.1257, 2017.

VANNIER-SANTOS, M. A.; URBINA, J. A.; MARTINY, A.; DE SOUZA. \ Alterations induced by the antifungal compounds icetoconazole and terbinafiie in *Leishmania*. **J. Ekaryot. Microbiol.**, 42: 337-346, 2002.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E., Visceral Leishmaniasis Recent Advances in Diagnostics and Treatment Regimens. **Infect Dis Clin N Am** v.33, p. 79–99, 2019.

VELEZ R.; GALLEGO M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. **Trop Med Int Health** 2020.

VENTURELLI, S.; BURKARD, M.; BIENDL, M.; LAUER, U. M.; FRANK, J.; E BUSCH, C. Chalconas e flavonoides prenilados para a prevenção e tratamento do câncer. **Rev. Nutrição** v.32, p.1171–1178. 2016

TIWARI, N.; GEDDA, M. R.; TIWARI, V. K. et al. Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.18, p.26-41, 2018.

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA T.; FILHO B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Recent Advances in Leishmaniasis Treatment. International. **Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525–532, 2011.

ULIANA, S. R. B.; TRINCINI, C. T. Chemotherapy of leishmaniose : presente challenges **Parasitology** v.154 p. 648-658, 2018.

VANANGAMUDI, G.; SUBRAMANIAN, M.; THIRUNARAYANAN, G. SYNTHESIS. Spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3- thienyl chalcones. **Arabian Journal of Chemistry** v.10, p.1257, 2017.

YANG, X., WANG, Y., BYRNE, R., SCHNEIDER, G., YANG, S. Concepts of artificial intelligence for computer-assisted drug discovery. **Chemical Reviews**. **119**(18), 10520-10-594. Disponível em: doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00728, 2019.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516– 1531, 1 out. 2017.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516– 1531, 2017.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; et al (orgs). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Florianópolis: Ed. da UFSC, Porto Alegre: Ed. da UFRGS. Cap. 23, p. 499-526, 2001.

ZOROVA, L. D. et al. Mitochondrial membrane potential. **Analytical Biochemistry**, v. 552, p. 50-59.

ZOROV, D. B.; JUHASZOVA, M.; SOLLITT, S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics**, v. 1757, n. 5-6, p. 509-517, maio 2006.

ZHU, Hongtian et al. Synthesis of chalcone derivatives: inducing apoptosis of HepG2 cells via regulating reactive oxygen species and mitochondrial pathway. **Frontiers in pharmacology**, p. 1341, 2019.

WIJNANT G. J. et al. Comparative efficacy, toxicity and biodistribution of the liposomal

amphotericin B formulations Fungisome® and AmBisome® in murine cutaneous leishmaniasis. **Drugs and Drug Resistance**, v.8, 2018.

WINTER, C., CAETANO, J.N., ARAÚJO, A.B.C., CHAVES, A.R., OSTROSKI, I.C., VAZ, B.G., PÉREZ, C.N. e ALONSO, C.G., (2016). Activated carbons for chalcone production: Claisen-Schmidt condensation reaction. ***Chemical Engineering Journal***. **303**, 604–610. Disponível em: doi: 10.1016/j.cej.2016.06.

ANEXOS

Anexo A. Comprovante de submissão do artigo 1 na revista Journal of Molecular Structure

 Journal of Molecular Structure

[Home](#) [Main Menu](#) [Submit a Manuscript](#) [About](#) [Help](#)

← Submissions Being Processed for Author ⓘ

Page: 1 of 1 ([1 total submissions](#)) Result

Action 		Manuscript Number 	Title 	Initial Date Submitted 	Status Date 	Current Status 
Action Links		MOLSTRUC-D-23-06685	Computer-aided drug design studies associated with in vitro antileishmanial tests of new chalcones	Oct 07, 2023	Oct 07, 2023	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 ([1 total submissions](#)) Result

Computer-aided drug design studies associated with *in vitro* antileishmanial tests of new chalcones

Gleice Rayanne da Silva^a, Fernando Ferreira Leite^a, Chonny Alexander Herrera Acevedo^a, Natália Ferreira de Sousa^a, Francisnaira da Silva Santos^{c,d}, Gabriela Bittencourt Grimaldi^d, Milena Botelho Pereira Soares^{d,e}, Elisalva Teixeira Guimarães^{c,d}, Marcus Tullius Scotti^a, Luis Cezar Rodrigues^f, Francisco Jaime Bezerra Mendonça^g, Eloísa Helena Campana^b, Hemerson Iury Ferreira Guimarães^b, Felipe Queiroga Sarmento Guerra^{a,b,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^bDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^cLaboratório de Histotécnica e Cultura Celular, Departamento de Ciências da Vida, Universidade do Estado da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

^dLaboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brasil

^eInstituto Senai de Inovação em Sistemas Avançados em Saúde, SENAI/CIMATEC, Salvador, Bahia, Brasil

^fPrograma de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

^gLaboratório de Síntese e Vetorização de Moléculas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brasil

*

Correspondence:

Felipe	Queiroga	Sarmento	Guerra
fgsg@academico.ufpb.br			

SILVA, G. R. – gleicerayanne@lft.ufpb.br

LEITE, F. F. – fernandoferreira_15@hotmail.com

ACEVEDO, C. A. H. - chonny622@gmail.com

SOUSA, N. F. – nferreiradesousa.nfs@gmail.com

SANTOS, F. S. - santosnaira89@gmail.com

GRIMALDI, G. B. - gabrielagrimaldi16.1@bahiana.edu.br

SOARES, M. B. P. - milena.soares@fiocruz.br

GUIMARÃES, E. T. - elisavaguimaraes@gmail.com

SCOTTI, M. T. - mtscotti@gmail.com

RODRIGUES, L. C. - luiscezarodrigues@gmail.com

MENDONÇA, F. J. B. – franciscojaime@servidor.uepb.edu.br

CAMPANA, E. H. - elocampana@gmail.com

MAGALHÃES, H. I. F. - hemersonufpb@gmail.com

GUERRA, F. Q. S. - fqsg@academico.ufpb.br

Abstract

In silico studies have been used as efficient tools in the search for new drugs. Reducing time, cost and greater planning for future tests are some of the advantages of this technique. In addition, its association with *in vitro* tests allows for more reliable and useful results in the search for pharmacologically active substances. In this sense, science has been searching for new molecules for the treatment of leishmaniasis, an endemic and neglected disease, which have low toxicity, a reduced resistance profile and milder adverse effects than those produced by the drugs available on the market. Therefore, the aim of this study was to investigate *in silico* the possible pharmacological activities of four novel chalcones and *in vitro* their leishmanicidal potential, associated with molecular docking. Initially, an *in silico* study was carried out to predict the activity spectra of the substances using the PASS filtering program. In the cytotoxicity evaluation, murine macrophages (J774) were used and treated with different concentrations of the chalcones. In the *in vitro* cell viability tests we used *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes (MHOM/BR88/BA-3456) which were cultivated in 96-well plates and submitted to concentrations of the substances. At the end, the selectivity index was calculated through the ratio between the 50% cytotoxicity concentration (CC₅₀) value obtained in macrophages and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) value obtained in promastigotes and amastigotes treated with chalcones. Molecular docking was performed using *Molegro Virtual Docker* 6.0, in order to elucidate a possible route that contributes to the leishmanicidal effect of the most promising substance. The results indicated that one of the biological activities

most associated with flavonoids has been the antileishmanial activity. All chalcones tested did not show significant cytotoxicity and the chalcone that showed the best potency was compound 4 (FERAI), with CI_{50} of $9.75 \pm 1.7 \mu M$ and $10.13 \pm 1.7 \mu M$ for promastigotes and amastigotes of *L. braziliensis*, respectively. Macrophages treated with FERA1 showed a reduction in infection and amastigotes number. The results of molecular docking indicated that an interaction occurred with the enzymes UDP-Glycosyl pyrophosphorylase, dihydroorotate dehydrogenase and trypanothione reductase, being more potent in the inhibition of the last two. In view of the results observed in the *in silico* prediction, it can be concluded that all the compounds showed antileishmanial activity. In *in vitro* tests, this activity was confirmed, as well as not showing significant cytotoxicity on macrophages. Molecule 4 showed promising inhibitory potency against *L. braziliensis* promastigotes and amastigotes *in vitro* and it is hypothesized that the mechanism of action may be through inhibition of the proteins dihydroorotate dehydrogenase and trypanothionein reductase.

Keywords: flavonoids¹, computer-aided drug design², homology modelling³, molecular docking⁴, pharmacological activity⁵, neglected tropical diseases⁶

Introduction

In recent times, computer-aided drug design has emerged as a powerful tool with an important role to play in the development of new drug molecules. Structure-based drug design and ligand-based drug design, for example, are two techniques frequently used in computer-aided drug design (Mohammad et al., 2016). Within pharmacology, computational methods aim to complement *in vitro* and *in vivo* tests, resulting in a potential minimization of costs, experimental time and even a reduction in the need for animal tests, improving prediction and safety assessment (Raies; Bajic, 2016).

The process of researching and developing innovative new drugs using small molecules faces many challenges, such as those described in this text. The productivity of new drugs in the pharmaceutical industry remains in decline, despite investments in this area. There are several reasons for this trend, including high investments in raw materials for pharmacological tests without prior analysis or screening to reduce consumption. This is where computational chemistry comes into

its own, as it provides scientists with a mix of information for analyzing decisions in their workflow for developing new drugs (Yang; Wang; Byrne; Schneider; Yang, 2019). Because of this, research in the search for new drugs with therapeutic potential has intensified. *In silico* assays involving the application of computational technologies have shown promising results regarding natural products and their derivatives for the treatment of Leishmaniasis (Njogu et al., 2015). From these, it is possible to have a probability of bioactivity and the binding site to possible targets to obtain the action, proving to be a quick, easy technique that can generate time and money savings for researchers (Ochoa et al., 2016; Usha et al., 2018).

The leishmaniasis are a complex of endemic and neglected tropical diseases that have wide morbidity and mortality, exerting profound effect on the health of the global community (Al-Kamel, 2017; Bailey et al., 2017; Tripathi; Nailwal, 2021). Its evolution is intrinsically related to human activity, therefore, the main factors involved in the historical advance between *Leishmania* and its possible reservoirs are linked directly with the geographical progression of the land (Tripathi; Nailwal, 2021).

The transmission of Leishmaniasis occurs from the release of flagellated metacyclic promastigotes by the salivary glands during blood repass from *Phlebotomus* and *Lutzomyia* female mosquitoes. These promastigotes are then phagocytosed by dermal macrophages/histiocytes, where they transform obligatorily into the intracellular amastigote form. These pathogens are specialised and adapted to survive in the phagolysosome of the cell. They then multiply within the phagocytes of the host, usually macrophages and neutrophilic granulocytes, and may infect other cells after their release. Weeks later, the accumulation of inflammatory cells (macrophages, neutrophilic granulocytes, dendritic cells, T-cells) results in the development of a granuloma. The life cycle of the pathogen concludes when the mosquito ingests the amastigotes again during the feeding process, again following the phases. Humans are affected by leishmaniasis, however, they are not direct transmitters of the disease, as are dogs, small rodents and horses (Stebut, 2015).

Currently, it is estimated that this disease is endemic in 149 countries and that more than 1 billion people reside in these areas and are exposed to the risk of infection. In addition, around 30,000 new cases of Visceral Leishmaniasis (VL) and over 1 million new cases of Tegumentary Leishmaniasis (TL) are expected annually. However, more than 90% of new cases occur in only 13 countries, including Afghanistan, Bolivia, Brazil, Colombia, India and Peru (Sterveding, 2017; Who, 2021).

The different clinical manifestations can be explained by the large number of species that constitute the genus *Leishmania*, with at least 39 of these already reported in the literature (Calderon-Anyosa et al., 2018; Maurício, 2018). Among the species of greatest interest are: *L. infantum chagasi* and *L. donovani* that cause VL; and *L. amazonensis*, *L. braziliensis* and *L. major* causing LT. These presentations differ in immunopathology and as to morbidity and mortality (Schreifer et al., 2005; Lainson, 2010; Maurício, 2018).

In Brazil, the first compounds used in the treatment of leishmaniasis were antimonials, followed by pentavalent derivatives (Sb^{5+}), which remain to this day. The antimoniate-N-methyl glucamine is the drug of choice in the treatment of tegumentary and visceral leishmaniasis (Brasil, 2014). In cases of resistance or contraindication of these drugs, amphotericin B can be used. The major problems involved in the use of these drugs have been the high toxicity, high cost, long treatment and the serious adverse effects, depending on the compound, often intensified by the need for prolonged administration and the level of clinical resistance (Tiwari, 2018; Brasil, 2021).

Within the class of natural products with *in silico* leishmanicidal activity reported in the literature, chalcones, molecules belonging to the flavonoid group, stand out. In the search for therapeutic alternatives that overcome the toxicity of the compounds used in the clinic, besides their adverse effects and the process of resistance, researchers have also engaged *in silico* and *in vitro* tests, in which the results indicate a promising action of these compounds against species of the genus *Leishmania*, including, regarding the species that stand out in our country, such as *L. donovani*, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* (Miranda-Sapla et al., 2019; Singh et al., 2019; Gomes et al., 2021; Osman et al., 2022). Thus, the aim of this work was to perform an evaluation of the antileishmanial activity *in silico* of four novel chalcones and *in vitro* through tests against strains of *L. braziliensis*, aiming the prospection of alternative treatments for leishmaniases.

MATERIALS AND METHODS

Test products

The synthesis of new chalcones was carried out in the Organic Chemistry Laboratory of the Post-graduate Programme in Natural Products and Bioactive Synthetics of the Federal University of Paraíba.

The process was carried out from methylation, ethylation and allylation of the 4-hydroxybenzaldehyde, in isolation and individually, with subsequent Claisen-Schmidt condensation, giving rise to the first 3 chalcones, respectively. The fourth chalcone resulted from a bromination on vanillin, followed by ethylation and aldol condensation (Supplementary material) (Winter et al., 2016).

In silico study of activity spectra prediction for substances (PASS)

The four compounds were submitted to the evaluation of biological activities through the program PASS filter. This tool provides quantitative structure reactivity relationships from the decomposition of chemical structures into 2D and/or 3D descriptors, with consequent production of models obtained from bioactive ligands. Through this analysis, it is possible to predict the estimated activity spectrum of a compound as probable activity (Pa) and probable inactivity (Pi). The values of Pa and Pi range from 0,000 to 1,000. On this basis, a compound can be said to be experimentally active when $Pa > Pi$. When $Pa > 0.7$, the probability of experimental pharmacological activity is said to be high, values of $0.5 < Pa < 0.7$ indicates the probability of an average experimental pharmacological action. And if $Pa < 0.5$, the chance of having the activity experimentally is lower, however it can still indicate a chance of finding a new compound (Goel et al., 2010).

Parasite culture

Promastigote forms of *L. braziliensis* (MHOM/BR88/BA-3456) were cultured in Schneider's medium (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, ThermoFisher scientific, Waltham, MA USA), 50 µg/mL gentamicin (Life, Carlsbad, CA), pH 7.2 and incubated at 26°C. Parasites were counted daily in Neubauer chamber for five days. When they reached the stationary phase of growth, new *in vitro* passages of the parasites were performed (Dias et al. 2021).

Cytotoxicity test on macrophages in vitro

Murine macrophages of the J774 strain were used to evaluate the activity of the compounds, incubated in 96-well plates (1 x 10⁴ cells/well) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), supplemented with 10% fetal bovine serum (SIGMA) and 50 µg/mL gentamicin (Life) and maintained for 24 h in an incubator at 37°C, aerated with 5% CO₂. The different concentrations (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 µM) of the four compounds were tested,

in triplicates, incubated for 72 h. Subsequently, 20 μ L/well of AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) was added for 6 h. Reading in the spectrophotometer (Microplate reader, Spectramax 190, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) was performed at 570 and 600 nm. The results were expressed through the values of 50% cytotoxic concentration for cells (CC_{50}). Gentian violet (Synth, São Paulo, SP, Brazil) was used as a positive control (Dias et al., 2021).

Antileishmanial activity

Promastigotes of *L. braziliensis* (1×10^6 per well) were grown in 96-well plate in Schneider's medium (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO) and 50 μ g/ mL gentamicin (Life) and subjected to treatment with different concentrations (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125 μ M) of the four compounds alone. The parasites were incubated for 72 h at 26°C. Then, 20 μ L/well of AlamarBlue (Invitrogen) was added for 24 h. Reading was performed in the spectrophotometer at wavelengths of 570 and 600 nm. The percentage of axenic culture inhibition was determined based on the untreated control (Guedes et al. 2018).

Evaluation of the SI

The SI was calculated by the ratio between the CC_{50} value obtained in macrophages and the IC_{50} value obtained in promastigotes treated with the molecules under study. The SI is used to determine how much more active the tested molecule is against *leishmania* than toxic for the macrophage, indicating greater selectivity for the parasite and, at the same time, without causing damage to the viability of mammalian cells. The SI should be greater than one (>1) (Passos et al. 2015).

Infection of macrophages in vitro and treatment with FERAI

Murine J774 macrophages were cultured in 24-well plates at a concentration of 5×10^5 with round coverslips added to the wells beforehand and infected with *L. braziliensis* in stationary phase at a ratio of 10 parasites per macrophage. Different concentrations of FERAI (20 μ M, 10 μ M, 5 μ M, and 2.5 μ M), were added to the wells after washing with DMEM medium. AB (5 μ M) was used as a positive control. After 24 hours, the cells were fixed in methanol and stained by Giemsa (Dinâmica, Química

Contemporânea Ltda, SP, Brazil). The percentage of infected macrophages and the number of amastigotes per macrophage was determined by counting 100 cells/well.

Protein sequence alignment

Three proteins fundamental to the life maintenance of *Leishmania* species were used in the study, they are: Dihydroorotate Dehydrogenase, Trypanothioneione Reductase and UDP-Glycose Pyrophosphorylase. These proteins do not contain 3D structures in the Protein Data Bank (PDB <https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Bernsteins et al., 1997), due to this, the corresponding sequences were obtained from the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Next, a global alignment was performed with the sequence of a protein with known three-dimensional structure using the web tool Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), which aligns all protein sequences entered by a user. The alignment facilitated the investigation of the active site and the determination of the similarity and shared identity between the proteins.

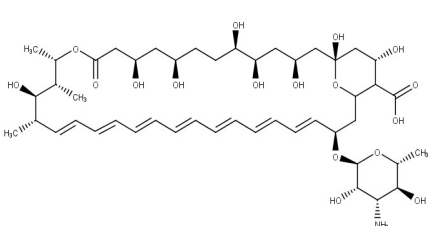
Homology modelling

Target sequences were obtained as aminoacid sequences in FASTA format and were imported into the SWISS-MODEL website (<https://swissmodel.expasy.org/>) (Waterhouse et al., 2018). For each identified template, the quality was predicted from alignment resources such as ProMod3, QMEAN and GMQE. The stereochemical quality of the templates were evaluated by the PSVS (protein structure validation software suite) web server (http://psvs-1_5-dev.nesg.org/), using PROCHECK (Laskowski et al., 1993). PROCHECK generates a Ramachandran plot (Lovell et al., 2003), which determines the allowed and disallowed regions of the main amino acid chain.

Molecular docking

Molecular docking was used to investigate the mechanism of action of the compound that showed more promise in the previous tests (ChS4), in order to elucidate a possible route that contributes to the leishmanicidal effect through the binding affinity of the compound to the enzymes selected in the study. For this, a screening with several proteins involved for these effects was performed. The 3D structures of the enzymes that served as templates for the elaborated models were obtained from the Protein Data Bank (PDB) (<https://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Bernsteins et al., 1977).

The selected proteins and detailed information about them can be visualized in Board 1.

Protein	PDB ID/Homology	Positive control
Dihydroorotate Dehydrogenase	Homology	 Amphotericin B
Trypanothione Reductase		
UDP-glucose pyrophosphorylase		

Board 1 - Information on the proteins selected in the study.

Molegro Virtual Docker v. 6.0.1 (MVD) software was used with the parameters predefined in it. The complexed ligand was used to define the active site. Then, the compounds were imported, to analyze the stability of the system through the identified interactions with the active site of the enzyme, taking as reference the energy value of the MolDock Score (Thomsen; Christensen, 2006).

The MolDock SE (Simplex Evolution) algorithm was used with the following parameters: A total of 10 runs with a maximum of 1,500 iterations using a population of 50 individuals, 2,000 minimization steps for each flexible residue and 2,000 global minimization steps per run. The MolDock Score function (GRID) was used to calculate the fitting energy values. A GRID was set to 0.3 Å and the search sphere was set to 15 Å radius. For the ligand energy analysis, internal electrostatic interactions, internal hydrogen bonds and sp²-sp² twists were evaluated.

Statistical analysis

The numerical values presented in the tables correspond to the means $\pm$ S.E.M from the triplicates of each experiment. The significance of the differences between the

groups was evaluated using the one way ANOVA test and the *Newman Keuls* multiple comparison post-test for the group of samples or analysis of variance. The critical limit of significance was set to $p \leq 0.05$.

RESULTS

Pass

In the *in silico* evaluation to predict the biological activities of the organic compounds (1-4) through their structural formulas using the "PASS filter" programme, the 15 activities most likely to be developed by these substances were recognised (Boards 2-5).

Chalcone 1		
Pa	Pi	Activity
0.935	0.002	1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (inhibitor)
0.921	0.003	Caspase 3 (stimulant)
0.886	0.005	Feruloyl esterase (inhibitor)
0.810	0.007	Apoptosis (agonist)
0.802	0.008	JAK2 expression (inhibitor)
0.774	0.042	Membrane integrity (agonist)
0.773	0.015	Antineoplastic
0.770	0.004	Carminative
0.760	0.002	NOS2 expression (inhibitor)
0.753	0.004	Interleukins (antagonist)
0.741	0.005	Antileukemic
0.718	0.004	Monophenol monooxygenase (inhibitor)
0.713	0.004	Beta glucuronidase (inhibitor)
0.704	0.009	Antiprotozoal (<i>Leishmania</i>)

Board 2 - Prediction of biological activity of chalcone 1.

Chalcone 2		
Pa	Pi	Activity
0.899	0.003	Caspase 3 (stimulant)
0.832	0.003	Carminative
0.806	0.035	Membrane integrity (agonist)
0.765	0.015	Feruloyl esterase (inhibitor)
0.719	0.013	Apoptosis (agonist)
0.707	0.061	Aspulvinone dimethylallyltransferase (inhibitor)
0.706	0.004	1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (inhibitor)
0.700	0.057	Mucomembrane (protector)
0.669	0.005	GABA aminotransferase (inhibitor)
0.649	0.011	Antiprotozoal (<i>Leishmania</i>)
0.625	0.040	Antineoplastic
0.619	0.013	Coronary vasodilator
0.606	0.028	Neurotransmitter uptake (inhibitor)
0.578	0.006	Transcription factor (inhibitor)
0.562	0.020	MMP9 expression (inhibitor)

Board 3 - Prediction of biological activity of chalcone 2.

Chalcone 3		
Pa	Pi	Activity
0.974	0.001	1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (inhibitor)
0.967	0.002	Caspase 3 (stimulant)
0.955	0.003	Membrane integrity (agonist)
0.941	0.001	Carminative
0.900	0.004	Feruloyl esterase (inhibitor)
0.872	0.002	GABA aminotransferase (inhibitor)
0.831	0.003	MMP9 expression (inhibitor)
0.824	0.006	JAK2 expression (inhibitor)
0.780	0.005	Antiprotozoal (<i>Leishmania</i>)

0.775	0.005	Neurotransmitter uptake (inhibitor)
0.751	0.004	MAP kinase (stimulant)
0.745	0.037	Mucomembranes (protective)
0.707	0.016	Antidyskinetic
0.706	0.062	Aspulvinone dimethylallyltransferase (inhibitor)
0.703	0.014	Apoptosis (agonist)

Board 4 - Prediction of biological activity of chalcone 3.

Chalcone 4		
Pa	Pi	Activity
0.970	0.001	1-Acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase (inhibitor)
0.955	0.003	Caspase 3 (stimulant)
0.931	0.005	Membrane integrity (agonist)
0.911	0.002	Carminative
0.848	0.007	Feruloyl esterase (inhibitor)
0.809	0.004	Neurotransmitter uptake (inhibitor)
0.792	0.003	GABA aminotransferase (inhibitor)
0.767	0.004	MMP9 expression (inhibitor)
0.753	0.007	Antiprotozoal (<i>Leishmania</i>)
0.750	0.018	Antineoplastic
0.735	0.012	Apoptosis (agonist)
0.735	0.014	JAK2 expression (inhibitor)
0.730	0.043	Mucomembranes (protective)
0.719	0.014	Antidyskinetic
0.707	0.005	MAP kinase (stimulant)

Board 5 - Prediction of biological activity of chalcone 4.

Considering that the studies carried out are a prediction, that is, there is a probable possibility that they will happen, we sought other subsidies that could help in the choice of the biological activity to be researched. To this end, an investigation was conducted

in the literature, observing the relationship of the selected activities for each compound using as descriptors the English words "*flavonoids*" OR "*chalcones*", corresponding chemical class of these substances, associated with the pharmacological activity to be researched, in the SciELO, PubMed, Medline, LILACS and ScienceDirect databases, during the period from 2017 to 2021.

Inclusion criteria included articles that related the chemical classes with at least one of the 15 selected pharmacological activities and that produced a promising action on the targets, having been published in the last five years. As exclusion criteria were removed from the plan the articles that, although relating the chemical classes with the activities, did not demonstrate a potentially auspicious action.

The results showed that one of the biological activities most associated with flavonoids has been the antileishmanial activity against the most diverse existing species. A number of studies have reported a leishmanicidal action of compounds of this class, such as: fisetin, a polyphenolic flavonoid, which has potent action against *Leishmania* spp. *in vitro* tests (Adinehbeigi et al., 2017); purified dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* with *in vitro* against promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis* (Rocha et al., 2018); flavonoids isolated from *Polygonum salicifolium* performed leishmanicidal activity *in vitro* against *L. mexicana* (Zheoat et al, 2021); rusflavone, a biflavonoid isolated from the pollen of *Attalea funifera*, has been shown to act against the promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*, through a mechanism that involves the production of reactive oxygen species, mitochondrial dysfunction, and membrane disruption in the parasites (Gomes et al., 2021).

Departing specifically for chalcones, scientific research can also be found indicating a broad leishmanicidal activity against different species of the genus *Leishmania* (Alonso et al., 2020). The studies of Nardella et al. (2018) indicated that the most active compounds against *Leishmania* spp. belong to the chalcone, biflavone and aurone classes, regardless of the assay performed, whether *in vitro* or *in vivo*. The phytochemical evaluation of the chalcones, 2',4'-dimethoxy-6'-hydroxychalcona and 2',5'-dimethoxy-4',6'-dihydroxychalcona, showed a promising antileishmania activity against *L. mexicana*, with absence of any toxicity in tests with a human cell line (Zheoat et al., 2021). The leishmanicidal activity of 31 synthetic chalcones was analysed using promastigotes and amastigotes of *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major* and *L. infantum* *in vitro* tests, the results indicated that 16 of these compounds were active against the

strains, showing high selectivity and low toxicity against mammalian cells (Ortalli et al., 2018).

In view of the above, it was decided to proceed with the research of the antileishmanial activity of the compounds, initially *in vitro*, for screening analysis and, subsequently, with more complex tests.

Cytotoxicity and antileishmanial activity of compounds

The CC₅₀ detection was performed in J774 murine macrophages strain and the results regarding each compound were compared with gentian violet (CC₅₀ = 0.6 ± 0.01 µM), a known cytotoxic drug, or amphotericin B (AB), the reference antileishmanial drug (CC₅₀ = 3.6 ± 0.50 µM). All chalcones presented values of CC₅₀ higher than amphotericin B (CC₅₀ >50) (Board 6).

	Promastigotes of <i>L. braziliensis</i>	Murine macrophage (J774)
Compounds	***IC ₅₀ ± DP (µM)	***CC ₅₀ ± DP (µM)
01	>50	>50
02	>50	>50
03	>50	>50
04	9.75 ± 1.7	>50
Amphotericin B	0.32 ± 0.01	ND
Gentian violet	ND	0.6 ± 0.01

Board 6 - Antileishmanial activity on *L. braziliensis* promastigotes and cytotoxicity on murine macrophages of compounds (1-4)

Antileishmanial activity in axenic culture was used in the calculation of the IC₅₀ value, in order to evaluate the activity of the compounds against promastigotes of *L. braziliensis*. The molecules 1-3 did not show a promising inhibitory potency in this test, obtaining IC₅₀ values above 50 µM, when compared with AB used as a positive control (IC₅₀ = 0.32 ± 0.01 µM). The molecule 4 was the most potent in inhibiting the growth of *L. braziliensis* promastigotes, with IC₅₀ value of 9.75 ± 1.7 µM (Board 5). In view of

these results, we decided to continue with the tests with chalcone 4, now called "FERAI", because it proved to be the most promising in the tests performed.

Antileishmanial activity and selectivity index of compounds on *L. braziliensis* amastigotes

When evaluated for pharmacological activity, FERA showed an IC_{50} value of $10.13 \pm 1.7 \mu M$ for amastigotes, in board 6 it is possible to observe this value together with the respective value for promastigotes obtained previously. AB, a commercially available drug for the treatment of leishmaniasis, this drug showed IC_{50} value of $0.7 \pm 0.004 \mu M$ for *L. braziliensis* amastigotes. The SI was calculated from the ratio between the CC_{50} and IC_{50} values, showing how much more selective the molecule is for the parasite than for mammalian cells. In this context, when evaluating the selectivity index of FERA, it is observed that this compound was 6.8 times more potent for promastigotes and 6.6 times more potent for *L. braziliensis* amastigotes than for mammalian cells, while AB was 11.25 and 5.14 times, respectively (Board 7). FERA showed a higher selectivity index for amastigotes than AB, the reference drug.

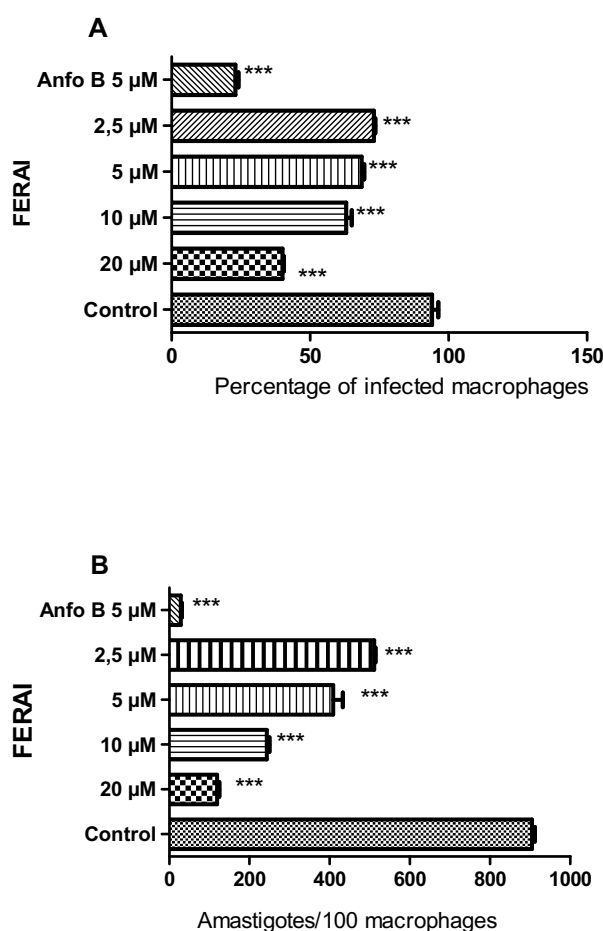
Moléculas	MØ J774 $CC_{50} \pm DP$ (μM)	Promastigotas $IC_{50} \pm DP$ (μM)	IS	Amastigotas $IC_{50} \pm DP$ (μM)	IS
FERAI	66 ± 0.12	9.75 ± 1.7	6.8	10.13 ± 1.7	6.6
Anfo B	3.6 ± 0.50	0.32 ± 0.01	11.25	0.7 ± 0.004	5.14
VG	0.6 ± 0.01	ND	ND	ND	ND

Board 7 - Activity and SI of FERA against promastigotes and amastigotes of *L. braziliensis*

VG= Gentian Violet; CC_{50} = 50% cytotoxic concentration; CI_{50} = 50% inhibitory concentration; IS= selectivity index. Values calculated from two independent experiments.

Infection and treatment of macrophages in vitro with *L. braziliensis* amastigotes

Murine macrophages of the J774 strain were infected with *L. braziliensis* amastigotes and treated with different concentrations of FERAI. FERAI caused a reduction concentration-dependent in the percentage of macrophages infected and in the number of amastigotes by macrophages, when compared to the control group. As expected, AB also decreased the number of infected macrophages and the number of amastigotes per 100 cells (Graph 1A and 1B).



Graph 1A,B - Macrophages infection by *L. braziliensis* and treatment with FERAI

Protein sequence alignment

The shared amino acids between the sequences of the target and template proteins were investigated. The results showed that the trypanothione reductase enzyme for *L.*

braziliensis obtained 84.01% identity with the trypanothione reductase enzyme from *L. infantum* (PDB: 3JK6). While the Dihydroorotate Dehydrogenase enzyme for *L. braziliensis* obtained 84.66% identity with the Dihydroorotate Dehydrogenase enzyme from *L. major* (PDB: 6EBS) (supplementary material).

The last evaluated enzyme was the UDP-Glycosylase Pyrophosphorylase from *L. braziliensis*, which presented 96.93% of identity with the enzyme Dihydroorotate Dehydrogenase from *L. major* (PDB: 2OEF).

Homology modelling

The models of the enzymes: Dihydroorotate Dehydrogenase, Trypanothione reductase and UDP-Glycosyl Pyrophosphorylase were generated by the homology modelling method. The reliability of the models was assessed using the Ramachandran plot, which represents all possible combinations of dihedral angles Ψ (psi) versus ϕ (phi) for each amino acid in a protein except glycine, which has no side chains, and the models are considered reliable when more than 90% of the amino acids are present in the allowed and/or favoured regions (coloured regions of the plot). Blank regions represent discrepant values, with poor contacts. The Dihydroorotate Dehydrogenase enzyme model generated showed 91.8% amino acids in the favored regions and 8.2% in the allowed regions. While the model of the Trypanothione reductase enzyme showed 91.6% of amino acids in the favored regions and 8% in the allowed regions. Finally, for the model of the UDP-Glycosylase Pyrophosphorylase enzyme, percentages corresponding to 93.5% of amino acids in the favored regions and 6.3% in the allowed regions were present. Thus, in view of the results, it is verified that the homology models were considered reliable (Figure 1).

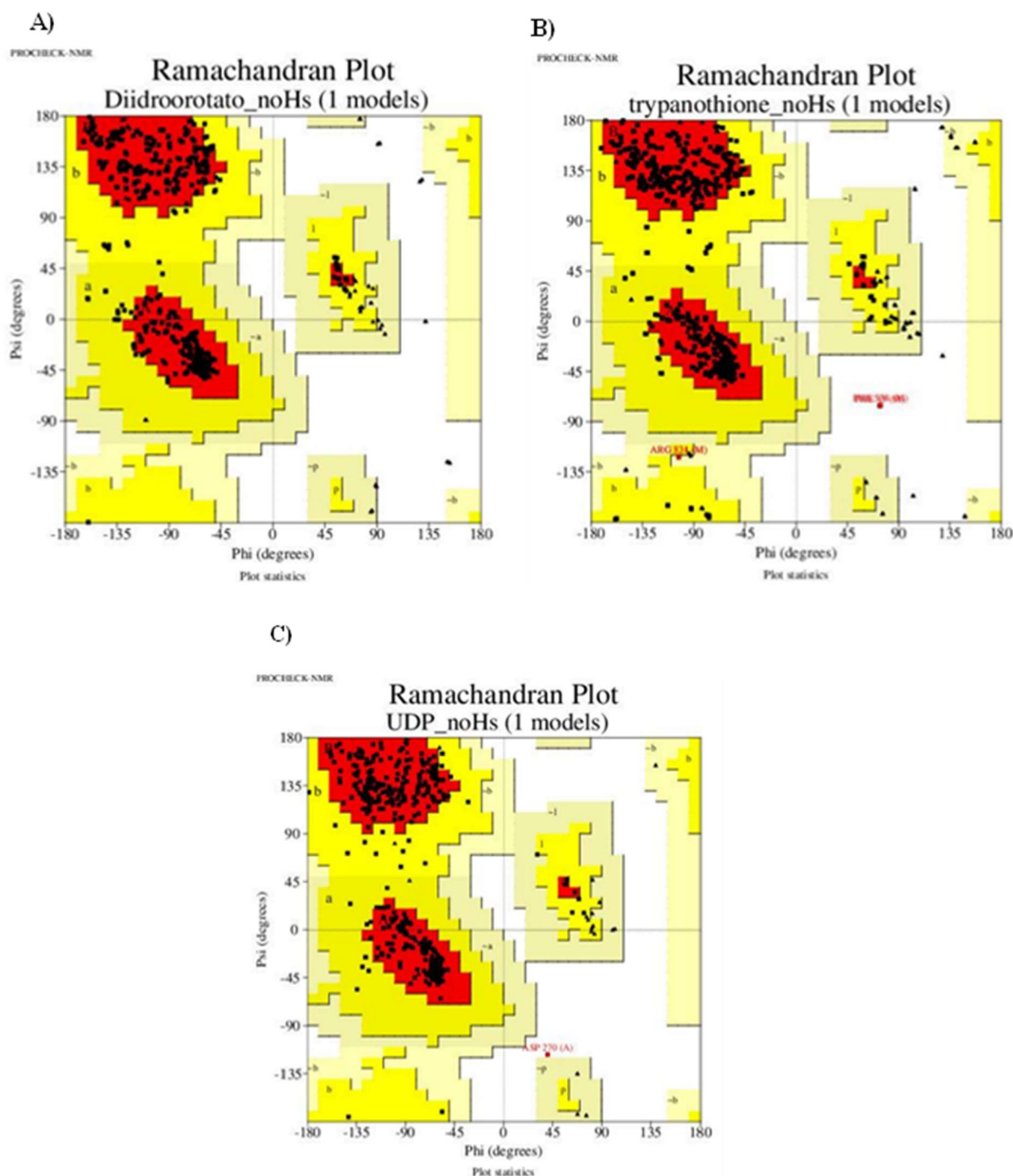


Figure 1 – Ramachandran plot of the homology model generated for the enzymes: Dihydroorotate Dehydrogenase (A), Trypanothione Reductase (B) and UDP Glucose Pyrophosphorylase (C). Source: Author, 2021.

Molecular docking

Chalcone 4 was subjected to screening by molecular docking on 03 proteins. Docking results were generated using two scoring functions, Moldockscore and Rerankscore. More negative values indicated better predictions for most of the scoring functions. The

protein in which the compound obtained binding energy values higher or close to the standard drug in at least one scoring function was considered active (Table 1).

Table 1 - Binding energy values analysed in the three selected proteins in the study.

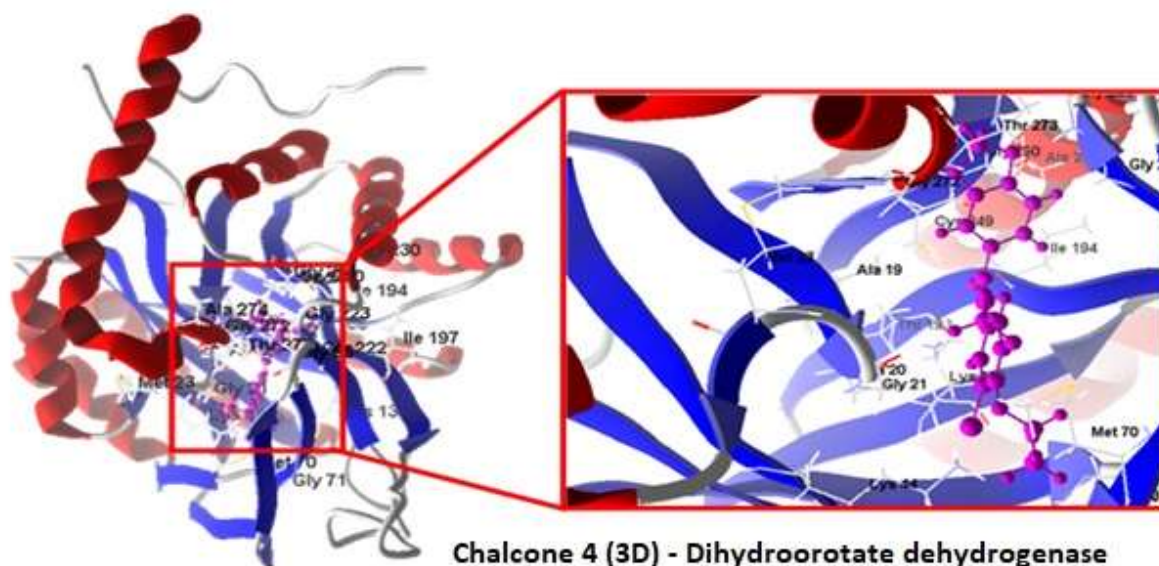
Protein	ChS4		Amphotericin B - Positive control	
	Moldockscore	Rerankscore	Moldockscore	Rerankscore
	e	e	e	e
Dihydroorotate Desidrogenase	-132.276	-95.1107	-43.403	1141.65
Trypanothione Reductase	-151.281	-317.774	-102.191	-282.763
UDP-Glyucose Pyrophosphorylase	-56.8384	-39.1568	-146.389	-64.8544

According to the results, of the three proteins analysed, chalcone 4 obtained negative energies in all the enzymes under study. Moreover, it obtained in a more specific way good results with the proteins Dihydroorotate Dehydrogenase and Trypanothione Reductase, and it was observed that the compound investigated obtained values higher or close to the values of MolDockscore and Rerankscore when compared with the controls. Chalcone 4 was more potent against the proteins Dihydroorotate Dehydrogenase and Trypanothione Reductase, with binding affinity values of -132.276 and -151.281 Kcal/mol, respectively.

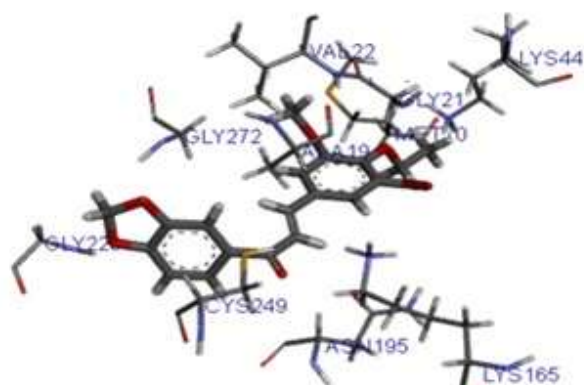
We analyzed in detail the interactions established by the test compound with the proteins in which this compound obtained binding affinity results higher than the standard drug, that is, we analyzed the interactions and bonds formed with the test compound and the Dihydroorotate Dehydrogenase and Trypanothione Reductase proteins.

The test compound was able to form four hydrophobic interactions with the amino acids Val 22, Ala 19, Cys 249 and Met 70, besides also making seven hydrogen bonds with the amino acids Lys 44, Gly 21, Gly 272, Gly 223, Cys 249, Asn 195 and Lys 44 with the active site of the protein Dihydroorotate Dehydrogenase (Figure 2). While Amphotericin B formed seven hydrogen bonds with residues Ser 45, Asn 128, Lys 165, Gly 250, Ile 194, Thr 273, Ala 20 and Met 20, six hydrophobic interactions with residues Pro 73, Glu 29, Met 20, Met 23, Ala 19 and Cys 249 and twelve steric interactions with

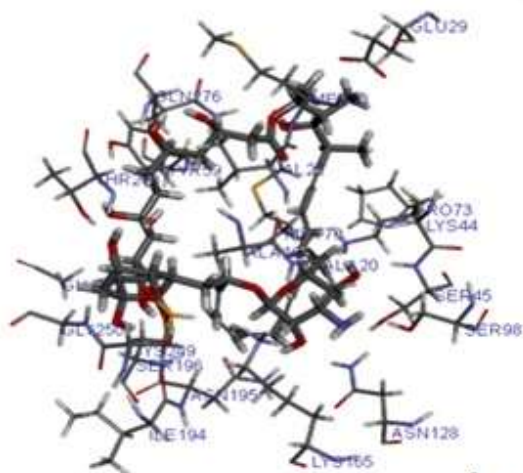
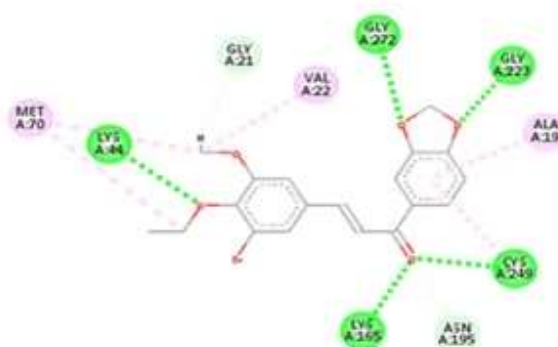
residues Met 20, Glu 29, Met 23, Val 12, Gln 276, Tyr 59, Ser 198, Gly 122, Asn 199, Ser 98, Lys 44 and Lys 165. It is worth noting that coincidences occurred in the hydrophobic interaction of residue Cys 249 between the positive control and the test compound.



Chalcone 4 (3D) - Dihydroorotate dehydrogenase



Chalcone 4



Amphotericin B

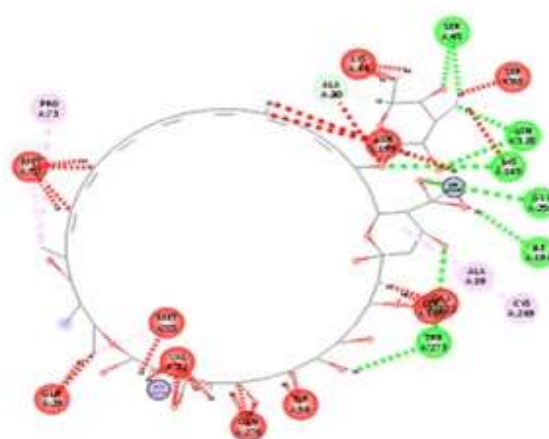


Figure 2 – 2D and 3D interactions between the chalcone 4, Amphotericin B and the protein Dihydroorotate Dehydrogenase.

Source: Author, 2021.

In the Trypanothione Reductase enzyme, the test compound established six hydrophobic interactions with the active site of this protein, among them: Thr 160, Ala 398, Ala 159, Val 36, Leu 10 and Val 34 and five hydrogen interactions, which corresponded to Gly 161, Ser 14, Asp 35, and Gly 15 (Figure 3). The compound Amphotericin B, on the other hand, presented five hydrogen bonds with residues Gly 49, Thr 51, Cys 57, Tyr 198 and Arg, besides ten steric interactions with residues Pro 336, Ile 339, Val 53, Cys 52, Ser 14, Asp 327, Met 333, Thr 51, Tyr 198 and Cys 57. A hydrophobic interaction with the amino acid Val 53 was also recorded. In this enzyme no similar interactions occurred between the test compound and the positive control.

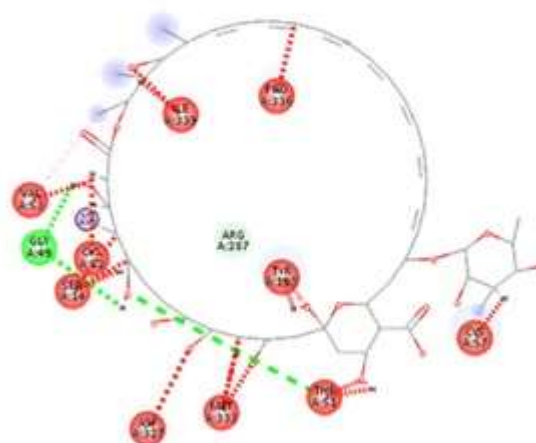
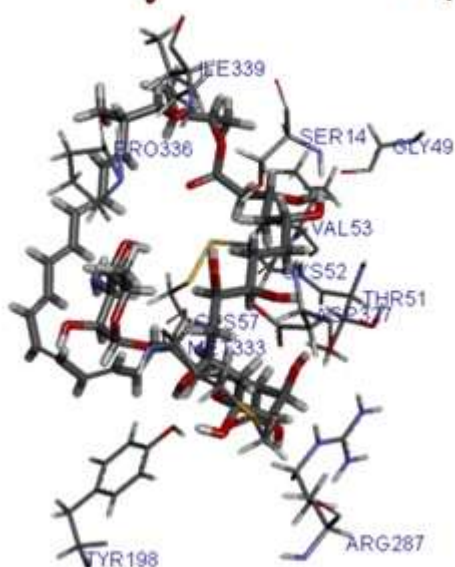
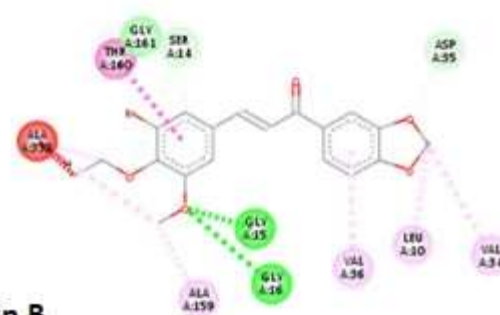
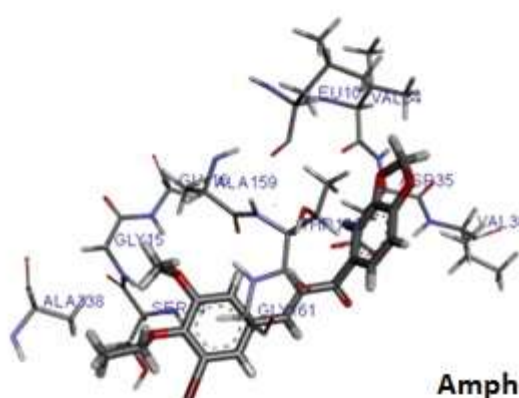
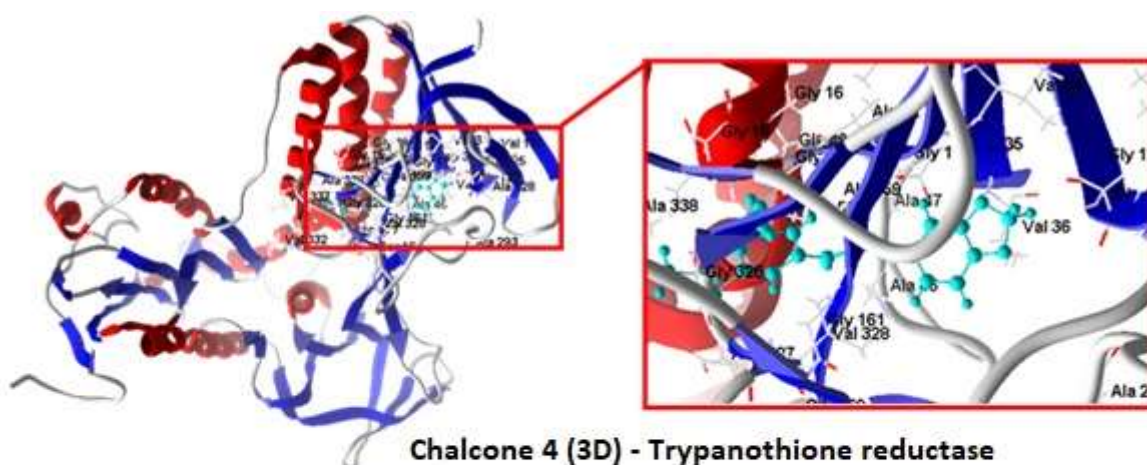


Figure 3 - 2D and 3D interactions between chalcone 4, Amphotericin B and trypanothione reductase enzyme.

Source: Author, 2021.

DISCUSSION

The use of computational chemistry, associated with bioinformatics, has been playing an innovative role in directing studies and drug planning, through the use of computer simulations (Oprea, 2005). In this context, the use of *in silico* models stands out, which have evolved with remarkable progress in several areas, such as: correlation, prediction, simplification, automation, among other expressive aspects (Cruz et al., 2019).

The evolution in the development of a new drug is without a doubt a very complex process that needs time and financial resources. Based on this, computer-aided studies aim to create new approaches that boost research and provide subsidies for further testing. The virtual screening for identification and optimization of other testing methodologies has been one of the advantages of these studies, from it it is possible to predict which pharmacological activities can be performed by a certain molecule, besides quantifying by a probability score of activity and inactivity (Yu; Mackerell Jr, 2016; Surabhi; Singh, 2018).

In the PASS tests performed with the substances with the purpose of having an initial screening regarding which pharmacological activity to follow with the studies, it was possible to observe that the four chalcones showed similar results for the 15 activities with higher probability of occurrence. The fact that the four substances belong to the same class could explain the occurrence of similar results among them, taking into account that the test works from the decomposition of the molecular structure in 2D and 3D descriptors, which are already expected to be common among them.

Based on a literature search, seeking to elect the pharmacological activity that was most related to the chemical class of chalcones, it was observed that the antileishmania activity has been one of the main ones to be researched and that, concomitantly, these substances showed a promising action with regard to potency and efficacy against the different existing species (Mello et al, 2018; N'guessan et al., 2021; Osman et al., 2022).

A number of studies have reported a leishmanicidal action of compounds of this class, such as: fisetin, a polyphenolic flavonoid, which has potent action against *Leishmania* spp. *in vitro* tests (Adinehbeigi et al. 2017); purified dimeric flavonoids from *Arrabidaea brachypoda* with *in vitro* against promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis* (Rocha et al. 2018); flavonoids isolated from *Polygonum salicifolium* performed leishmanicidal activity *in vitro* against *L. mexicana* (Zheoat et al. 2021);

rusflavone, a biflavonoid isolated from the pollen of *Attalea funifera*, has been shown to act against the promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*, through a mechanism that involves the production of ROS, mitochondrial dysfunction, and membrane disruption in the parasites (Gomes et al. 2021).

Departing specifically for chalcones, scientific research can also be found indicating a broad leishmanicidal activity against different species of the genus *Leishmania* (Alonso et al. 2020). The studies of Nardella et al. (2018) indicated that the most active compounds against *Leishmania* spp. belong to the chalcone, biflavone and aurone classes, regardless of the assay performed, whether *in vitro* or *in vivo*. The phytochemical evaluation of the chalcones, 2',4'-dimethoxy-6'-hydroxychalcone and 2',5'-dimethoxy-4',6'-dihydroxychalcone, showed a promising antileishmania activity against *L. mexicana*, with absence of any toxicity in tests with a human cell line (Zheoat et al. 2021). The leishmanicidal activity of 31 synthetic chalcones was analysed using promastigotes and amastigotes of *L. donovani*, *L. tropica*, *L. major* and *L. infantum* *in vitro* tests, the results indicated that 16 of these compounds were active against the strains, showing high selectivity and low toxicity against mammalian cells (Ortalli et al. 2018). In view of this, it was decided to continue the studies in this area.

Cytotoxicity assays are among the main *in vitro* tests used at the beginning of studies with natural products, from these it is possible to predict the toxicity of substances in several cell types, providing a fundamental means for the evaluation, safety screening and classification of compounds. The monitoring of cell response within these assays provides reliable results and can serve as a basis for measuring other parameters such as cell viability and SI (Tolosa et al. 2014; Costa et al. 2020).

The results obtained by the cytotoxicity test performed on murine macrophages demonstrated a low cytotoxicity of the four chalcones when compared with gentian violet ($CC_{50} = 0.6 \pm 0.01 \mu M$), with CC_{50} values above 50 μM . Encouraging results, as it is essential that new antileishmanial drug candidates have reduced cytotoxicity in order to overcome the disadvantages of drugs currently used in therapy.

Similar results were found in a study investigating the effects of twenty brominated chalcones against four cancer cell lines, where these substances exhibited lower cytotoxicity for non-malignant gastric epithelial cells than for diseased ones, demonstrating selectivity (Zhang et al. 2016). Researchers investigated the *in vitro* cytotoxicity of ten chalcones against the HeLa cell line through the MTT viability assay

and the calculation of the SI, the results pointed out a low cytotoxicity of these substances in this cell type (Sinha et al. 2019).

In the analysis of antileishmanial activity axenic culture by calculating the IC_{50} , it was observed that chalcones 1, 2 and 3 did not show promising inhibitory potency, unlike chalcone 4, which was the most potent in inhibiting the growth of *L. braziliensis* species, interesting result when added to the fact that this substance has low cytotoxicity when compared to AB, being a promising candidate for future tests

A number of studies have reported chalcones with potent antileishmanial activity against *L. braziliensis* species (Mello et al. 2014; Escrivani et al., 2021; Osman et al. 2022) . Two synthetic chalcones were evaluated *in vitro* against *L. braziliensis* promastigotes for inhibitory activity and cytotoxicity against macrophages. The results of IC_{50} and CC_{50} were, respectively, 1.38 ± 1.09 ; $6.36 \pm 2.04 \mu\text{M}$, and 13.49 ± 3.13 ; $199.43 \pm 4.11 \mu\text{M}$, indicating that both chalcones showed an effect on *L. braziliensis* promastigotes, with low toxicity to mammalian cells (Mello et al. 2014).

Similar results were found in a study involving three methoxychalcones, which showed significant antileishmanial activity against *L. braziliensis* promastigotes *in vitro* tests ($IC_{50} = 2.7 \mu\text{M}$; $3.9 \mu\text{M}$; and $4.6 \mu\text{M}$), with a more potent action than the control drug pentamidine ($IC_{50} = 6.0 \mu\text{M}$) (Bello et al. 2011).

Given the results, it was hypothesized that the addition of bromine to molecule 4 optimized its antileishmanial effects in relation to the other molecules. Reports in the literature already relate brominated synthetic substances with a superior bioactive potential, although the mechanisms that explain these results are not yet fully elucidated, one can cite several possibilities, such as: elevation of lipophilicity and permeability through biological membranes, increased half-life or the ability to form intermolecular bonds (attractive interactions) between the electrophilic region of the molecule containing bromine atoms and nucleophilic active sites of biomolecules. Thus, bromination can lead to increased potency of therapeutic agents and research in the area of chemoinformatics can provide important contributions to the elucidation of molecular interactions (Jitareanu et al. 2018). Thus, we decided to continue our studies with chalcone 4, now entitled FERAI, with tests investigating its action on *L. braziliensis* amastigotes and evaluating the compound's SI.

The *L. braziliensis* species is related to a possible metastasis and mucosal form of leishmaniasis, hence the importance of developing more effective and less toxic drugs for the treatment of this disease (Brasil 2017; Vasconcelos et al. 2018). When the

pharmacological activity of FERAI was evaluated against amastigotes of *L. braziliensis*, an IC_{50} value of $10.13 \pm 1.7 \mu M$ was found. AB, a drug commercially available for the treatment of leishmaniasis, showed an IC_{50} value of $0.7 \pm 0.004 \mu M$. Although FERAI presented a higher inhibitory concentration, this result still showed promise and added to its low toxicity compared to AB, this compound shows that it can be a candidate for future drug for the treatment of leishmaniasis. In addition, macrophages were infected with amastigotes of *L. braziliensis* and treated with different concentrations of FERAI resulted in a reduction both in the number of infected macrophages and in the number of amastigotes per macrophage, confirming a significant action of this substance on the intracellular forms of *L. braziliensis*.

Protein sequence alignment is a tool that helps to verify the similarity and identity of the same protein from different species or different proteins from the same species. With this technique, it is possible to analyse the conserved regions and identify common residues of the active site. In addition, it is possible to point out differences and structural similarities that can contribute to drug development. Thus, the amino acids shared between the sequences of the target and template proteins have been investigated (Gao; Skolnick, 2021; Kong et al., 2022).

In our study, we performed the alignment of the protein sequences of the trypanothione reductase enzyme for *L. braziliensis* with the trypanothione reductase from *L. infantum*, the dihydroorotate dehydrogenase enzyme for *L. braziliensis* with the dihydroorotate dehydrogenase enzyme from *L. major* and finally the UDP-Glycosylase Pyrophosphorylase from *L. braziliensis* with the dihydroorotate dehydrogenase enzyme from *L. major*. The alignment results showed that the target protein sequences presented a high degree of identity and similarity, which enabled the construction of reliable homology models of these proteins.

One of the computational tools of greatest interest today in science is called molecular docking, when applied to the analysis of natural products as candidates for new drugs makes it possible to obtain data on possible mechanisms of action, molecular interactions and degree of binding between the substance and its target (Fu; Zhao; Chen, 2018; Pinzi; Rastelli, 2019). Besides being a fast, low-cost and efficient technique, it is very useful for those working with natural products, especially synthetics, allowing a reduction of material losses and better use of the substances (Liu; Liu; Zheng et al., 2018; Fan; Fu; Zhang, 2019).

In the molecular docking results, chalcone 4 obtained negative energies in all enzymes under study, thus demonstrating that there was interaction with all the targets under study. Moreover, it interacted more specifically with the proteins dihydroorotate dehydrogenase and trypanothione reductase, and this result may be associated with a certain specificity of the compound, since it showed higher energy than the ligand in two specific targets. Thus, these results indicate the potentiality of the compound through these mechanisms of action.

CONFLICT OF INTEREST

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

FUNDING SOURCE

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Federal University of Paraíba and the Postgraduate Programme in Natural Products and Bioactive Synthetics for the institutional support, as well as the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) of Bahia-BR for the instrumental and technological support.

REFERENCES

- Adinehbeigi, K., Razi Jalali, M.H., Shahriari, A. e Bahrami, S., (2017). *In vitro* antileishmanial activity of fisetin flavonoid via inhibition of glutathione biosynthesis and arginase activity in *Leishmania infantum*. *Pathogens and Global Health*. **111**(4), 176–185. Disponível em: doi: 10.1080/20477724.2017.1312777
- Al-Kamel, M.A., (2017). Stigmata in cutaneous leishmaniasis: Historical and new evidence-based concepts. *Our Dermatology Online*. **8**(1), 81–90. Disponível em: doi: 10.7241/ourd.20171.21
- Alonso, L., Menegatti, R., Gomes, R.S., Dorta, M.L., Luzin, R.M., Lião, L.M. e Alonso, A., (2020). Antileishmanial activity of the chalcone derivative LQFM064 associated with reduced fluidity in the parasite membrane as assessed by EPR spectroscopy. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. **151**, 105407. Disponível em: doi: 10.1016/j.ejps.2020.105407

- Bailey, F., Mondragon-Shem, K., Hotez, P., Ruiz-Postigo, J.A., Al-Salem, W., Acosta-Serrano, Á. e Molyneux, D.H., (2017). A new perspective on cutaneous leishmaniasis—Implications for global prevalence and burden of disease estimates. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. **11**(8), número do artigo: e0005739. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pntd.0005739
- Bello, M.L., Chiaradia, L.D., Dias, L.R.S., Pacheco, L.K., Stumpf, T.R., Mascarello, A., Steindel, M., Yunes, R.A., Castro, H.C., Nunes, R.J. e Rodrigues, C.R., (2011). Trimethoxy-chalcone derivatives inhibit growth of *Leishmania braziliensis*: Synthesis, biological evaluation, molecular modeling and structure–activity relationship (SAR). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **19**(16), 5046–5052. Disponível em: doi: 10.1016/j.bmc.2011.06.023
- Bernstein, F.C., Koetzle, T.F., Williams, G.J.B., Meyer, E.F., Brice, M.D., Rodgers, J.R., Kennard, O., Shimanouchi, T. e Tasumi, M., (1977). The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures. *Journal of Molecular Biology*. **112**(3), 535–542. Disponível em: doi: 10.1016/s0022-2836(77)80200-3
- Brasil. (2021). Leishmaniose visceral. *Ministério da Saúde*. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/leishmaniose-visceral> [Acesso em 03 de março de 2022]
- Brasil. (2014). Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. *Ministério da Saúde*. **1ª**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmanios_e_visceras_1edicao.pdf [Acesso em 03 de março de 2022]
- BRASIL. (2017). Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Ministério da Saúde*. **2ª**. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf [Acesso em 03 de março de 2022]
- Calderon-Anyosa, R., Galvez-Petzoldt, C., Garcia, P.J. e Carcamo, C.P., (2018). Housing Characteristics and Leishmaniasis: A Systematic Review. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. **99**(6), 1547–1554. Disponível em: doi: 10.4269/ajtmh.18-0037
- Costa, C.A., Lopes, R.M., Ferraz, L.S., Esteves, G.N.N., Di Iorio, J.F., Souza, A.A., de Oliveira, I.M., Manarin, F., Judice, W.A.S., Stefani, H.A. e Rodrigues, T., (2020). Cytotoxicity of 4-substituted quinoline derivatives: Anticancer and antileishmanial potential. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **28**(11), 115511. Disponível em: doi: 10.1016/j.bmc.2020.115511
- Cruz, J.H.D.A., Moreira, I.C.D.S., Alves, M.D.F.V., Oliveira, H.M.B.F.D., Oliveira Filho, A.A.D. e Alves, M.A.S.G., (2020). Análise da atividade farmacológica e toxicológica do monoterpeno relacionado à Odontologia: estudo *in silico*. *ARCHIVES OF HEALTH INVESTIGATION*. **8**(11). Disponível em: doi: 10.21270/archi.v8i11.4314
- Dias, J.S.M., Martins, F.T., de Araújo Neto, J.H., Castellano, E.E., Viana, R.B., Teixeira, J.D.S., Guimarães, E.T., Soares, M.B.P., Barbosa, M.I.F. e Doriguetto, A.C., (2021). Novel ruthenium(III) complexes with hydroxybenzophenones: experimental and theoretical characterization and *in vitro* leishmanicidal activity comparing complexes and ligands. *New Journal of Chemistry*. **45**(17), 7501–7515. Disponível em: doi: 10.1039/d0nj06159j

- Escrivani, D.O., Charlton, R.L., Caruso, M.B., Burle-Caldas, G.A., Borsodi, M.P.G., Zingali, R.B., Arruda-Costa, N., Pameira-Mello, M.V., Jesus, J.B., Souza, A.M.T.; Abraham-Vieira, B., Freitag-Pohl, S., Pohl, E., Steel, P.G., (2021). Chalcones identify cTXNPx as a potential antileishmanial drug target. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. **15**(11). Disponível em: doi: [10.1371/journal.pntd.0009951](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009951)
- Fan, J., Fu, A. e Zhang, L., (2019). Progress in molecular docking. *Quantitative Biology*. **7**(2), 83–89. Disponível em: doi: 10.1007/s40484-019-0172-y
- Fu, Y., Zhao, J. e Chen, Z., (2018). Insights into the Molecular Mechanisms of Protein-Ligand Interactions by Molecular Docking and Molecular Dynamics Simulation: A Case of Oligopeptide Binding Protein. *Computational and Mathematical Methods in Medicine*. **2018**, 1–12. Disponível em: doi: 10.1155/2018/3502514
- Gao, M. e Skolnick, J., (2020). A novel sequence alignment algorithm based on deep learning of the protein folding code. *Bioinformatics*. Disponível em: doi: 10.1093/bioinformatics/btaa810
- Goel, R.K., Singh, D., Lagunin, A. e Poroikov, V., (2010). PASS-assisted exploration of new therapeutic potential of natural products. *Medicinal Chemistry Research*. **20**(9), 1509–1514. Disponível em: doi: 10.1007/s00044-010-9398-y
- Gomes, A.N.P., Camara, C.A., Sousa, A.S., Santos, F.A.R., Santana Filho, P.C., Dorneles, G.P., Romão, P.R.T. e Silva, T.M.S., (2021). Chemical Composition of Bee Pollen and Leishmanicidal Activity of Rhusflavone. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **31**(2), 176–183. Disponível em: doi: 10.1007/s43450-021-00130-z
- Guedes, C.E.S., Dias, B.R.S., Petersen, A.L.D.O.A., Cruz, K.P., Almeida, N.D.J., Andrade, D.R., Menezes, J.P.B.D., Borges, V.D.M. e Veras, P.S.T., (2018). *In vitro* evaluation of the anti-leishmanial activity and toxicity of PK11195. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. **113**(4). Disponível em: doi: 10.1590/0074-02760170345
- Jitareanu, A., Tataringa, G., Zbancioc, A.M., Trifan, A., (2018). Bromination-A versatile tool for drugs optimization. *The Medical-Surgical Journal*. **122**(3).
- Kong, L., Ju, F., Zheng, W., Zhu, J., Sun, S., Xu, J., Bu, D., (2022). ProALIGN: Directly learning alignments for protein structure prediction via exploiting context-specific alignment motifs. *Journal of Computational Biology*. Disponível em: doi: [10.1089/cmb.2021.0430](https://doi.org/10.1089/cmb.2021.0430)
- Lainson, R., (2010). The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. **1**(2). Disponível em: doi: 10.5123/s2176-62232010000200002
- Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S. e Thornton, J.M., (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *Journal of Applied Crystallography*. **26**(2), 283–291. Disponível em: doi: 10.1107/s0021889892009944
- Liu, Z., Liu, Y., Zeng, G., Shao, B., Chen, M., Li, Z., Jiang, Y., Liu, Y., Zhang, Y. e Zhong, H., (2018). Application of molecular docking for the degradation of organic pollutants in the environmental remediation: A review. *Chemosphere*. **203**, 139–150. Disponível em: doi: 10.1016/j.chemosphere.2018.03.179
- Lovell, S.C., Davis, I.W., Arendall, W.B., de Bakker, P.I.W., Word, J.M., Prisant, M.G., Richardson, J.S. e Richardson, D.C., (2003). Structure validation by

C α geometry: ϕ, ψ and C β deviation. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*. **50**(3), 437–450. Disponível em: doi: 10.1002/prot.10286

Maurício, I.L., (2018). *Leishmania* Taxonomy. In: *The Leishmaniases: Old Neglected Tropical Diseases*. Cham: Springer International Publishing. pp. 15–30. Disponível em: doi: 10.1007/978-3-319-72386-0_2

Mello, M.V.P., Abraham-Vieira, B.D.A., Domingos, T.F.S., de Jesus, J.B., de Sousa, A.C.C., Rodrigues, C.R. e Souza, A.M.T.D., (2018). A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **150**, 920–929. Disponível em: doi: 10.1016/j.ejmech.2018.03.047

Miranda-Sapla, M.M., Tomiotto-Pellissier, F., Assolini, J.P., Carloto, A.C.M., Bortoleti, B.T.D.S., Gonçalves, M.D., Tavares, E.R., Rodrigues, J.H.D.S., Simão, A.N.C., Yamauchi, L.M., Nakamura, C.V., Verri, W.A., Costa, I.N., Conchon-Costa, I. e Pavanelli, W.R., (2019). Trans-Chalcone modulates *Leishmania amazonensis* infection *in vitro* by Nrf2 overexpression affecting iron availability. *European Journal of Pharmacology*. **853**, 275–288. Disponível em: doi: 10.1016/j.ejphar.2019.03.049

Mohammad, B., Khurshid, A., Sudeep, R., Jalaluddin, M. A., Mohd, A., Mohammad, H. S., Saif, K., Mohammad, A. K., Ivo, P., Inho, C., (2016). Computer aided drug design: Success and limitations. *Current Pharmaceutical Design*. **22**(5), 572-581. Disponível em: doi: 10.2174/1381612822666151125000550

Nardella, F., Gallé, J.B., Bourjot, M., Weniger, B. e Vonthron-Sénécheau, C., (2018). Antileishmanial and Antitrypanosomal Activities of Flavonoids. In: *Sustainable Development and Biodiversity*. Cham: Springer International Publishing. pp. 163–194. Disponível em: doi: 10.1007/978-3-319-67045-4_7

N'guessan, D.U.J.P., Alzain, A.A., Adouko, E.M. et al., (2021). MOLECULAR MODELING STUDIES OF BENZIMIDAZOLYL-CHALCONES AS ANTILEISHMANIAL AGENTS USING QSAR, DOCKING, ADME AND MOLECULAR DYNAMICS STUDIES. *Journal of Applied Pharmaceutical Sciences and Research*. **4**(3). Disponível em: doi: 10.31069/japsr.v4i3.4

Njogu, P.M., Guantai, E.M., Pavada, E. e Chibale, K., (2015). Computer-Aided Drug Discovery Approaches against the Tropical Infectious Diseases Malaria, Tuberculosis, Trypanosomiasis, and Leishmaniasis. *ACS Infectious Diseases*. **2**(1), 8–31. Disponível em: doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00093

Ochoa, R., Watowich, S.J., Flórez, A., Mesa, C.V., Robledo, S.M. e Muskus, C., (2016). Drug search for leishmaniasis: a virtual screening approach by grid computing. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*. **30**(7), 541–552. Disponível em: doi: 10.1007/s10822-016-9921-4

Oprea, T.I., ed., (2005). *Cheminformatics in Drug Discovery*. Wiley. Disponível em: doi: 10.1002/3527603743

Ortalli, M., Ilari, A., Colotti, G., De Ionna, I., Battista, T., Bisi, A., Gobbi, S., Rampa, A., Di Martino, R.M.C., Gentilomi, G.A., Varani, S. e Belluti, F., (2018). Identification of chalcone-based antileishmanial agents targeting trypanothione reductase. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **152**, 527–541. Disponível em: doi: 10.1016/j.ejmech.2018.04.057

Osman, M.S., Awad, T.A., Shantier, S.W. et al., (2022). Identification of some chalcone analogues as potential antileishmanial agents: An integrated *in vitro* and *in*

silico evaluation. *Arabian Journal of Chemistry*. **15**(4). Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.103717>

Passos, C.L.A., Ferreira, C., Soares, D.C. e Saraiva, E.M., (2015). Leishmanicidal Effect of Synthetic trans-Resveratrol Analogs. *PLOS ONE*. **10**(10), número do artigo: e0141778. Disponível em: doi: 10.1371/journal.pone.0141778

Pinzi, L. e Rastelli, G., (2019). Molecular Docking: Shifting Paradigms in Drug Discovery. *International Journal of Molecular Sciences*. **20**(18), 4331. Disponível em: doi: 10.3390/ijms20184331-

Raies, A. B., Bajic, V. B. (2016). *In silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. *Computational Molecular Science*. **6**(2), 147-172. Disponível em: doi: <https://doi.org/10.1002/wcms.1240>

Rocha, V., Quintino da Rocha, C., Ferreira Queiroz, E., Marcourt, L., Vilegas, W., Grimaldi, G., Furrer, P., Allémann, É., Wolfender, J.L. e Soares, M., (2018). Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. *Molecules*. **24**(1), 1. Disponível em: doi: 10.3390/molecules24010001

Schreifer, A.L.F., Souza, R.S., Guimarães, L.H., Góes-Neto, A., Schreifer, A., (2005). Papel do parasito e do hospedeiro na expressão clínica das leishmanioses. *Gazeta Médica da Bahia*. **139**, 1.

Singh, G., Arora, A., Kalra, P., Maurya, I.K., Ruizc, C.E., Estebanc, M.A., Sinha, S., Goyal, K. e Sehgal, R., (2019). A strategic approach to the synthesis of ferrocene appended chalcone linked triazole allied organosilatrane: Antibacterial, antifungal, antiparasitic and antioxidant studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. **27**(1), 188–195. Disponível em: doi: 10.1016/j.bmc.2018.11.038

Sinha, S., Batovska, D.I., Medhi, B., Radotra, B.D., Bhalla, A., Markova, N. e Sehgal, R., (2019). *In vitro* anti-malarial efficacy of chalcones: cytotoxicity profile, mechanism of action and their effect on erythrocytes. *Malaria Journal*. **18**(1). Disponível em: doi: 10.1186/s12936-019-3060-z

Stebut, E.V., (2015). *Reisedermatosen*. Springer. 191-202. Disponível em: doi: 10.1111/ddg.12595

Steverding, D., (2017). The history of leishmaniasis. *Parasites Vectors* **10**, 82. Disponível em: doi: 10.1186/s13071-017-2028-5

Surabhi, S. e Singh, B., (2018). COMPUTER AIDED DRUG DESIGN: AN OVERVIEW. *Journal of Drug Delivery and Therapeutics*. **8**(5), 504–509. Disponível em: doi: 10.22270/jddt.v8i5.1894

Thomsen, R. e Christensen, M.H., (2006). MolDock: A New Technique for High-Accuracy Molecular Docking. *Journal of Medicinal Chemistry*. **49**(11), 3315–3321. Disponível em: doi: 10.1021/jm051197e

Tiwari, N., Gedda, M.R., Tiwari, V.K., Singh, S.P. e Singh, R.K., (2017). Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*. **18**(1). Disponível em: doi: 10.2174/1389557517666170425105129

Tolosa, L., Donato, M.T. e Gómez-Lechón, M.J., (2014). General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay. In: *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. pp. 333–348. Disponível em: doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26

Tripathi, L.K. e Nailwal, T.K., (2021). Leishmaniasis: an overview of evolution, classification, distribution, and historical aspects of parasite and its vector. In: *Pathogenesis, Treatment and Prevention of Leishmaniasis*. Elsevier. pp. 1–25. Disponível em: doi: 10.1016/b978-0-12-822800-5.00004-4

Usha, T., Shanmugarajan, D., Goyal, A.K., Kumar, C.S. e Middha, S.K., (2018). Recent Updates on Computer-aided Drug Discovery: Time for a Paradigm Shift. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. **17**(30), 3296–3307. Disponível em: doi: 10.2174/1568026618666180101163651

Vasconcelos, J.M., Gomes, C.G., Sousa, A., Teixeira, A.B., Lima, J.M., (2018). Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*. **50**(3), 221-227. Disponível em: doi: 10.21877/2448-3877.201800722

Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R. e Schwede, T., (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Research*. **46**(W1), w296—w303. Disponível em: doi: 10.1093/nar/gky427

World Health Organization. (2021). Leishmaniasis. https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1 [Acesso em 15 de fevereiro de 2022]

Winter, C., Caetano, J.N., Araújo, A.B.C., Chaves, A.R., Ostroski, I.C., Vaz, B.G., Pérez, C.N. e Alonso, C.G., (2016). Activated carbons for chalcone production: Claisen-Schmidt condensation reaction. *Chemical Engineering Journal*. **303**, 604–610. Disponível em: doi: 10.1016/j.cej.2016.06.058

Yang, X., Wang, Y., Byrne, R., Schneider, G., Yang, S., (2019). Concepts of artificial intelligence for computer-assisted drug discovery. *Chemical Reviews*. **119**(18), 10520-10-594. Disponível em: doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00728

Yu, W. e MacKerell, A.D., (2016). Computer-Aided Drug Design Methods. In: *Methods in Molecular Biology*. New York, NY: Springer New York. pp. 85–106. Disponível em: doi: 10.1007/978-1-4939-6634-9_5

Zhang, S., Li, T., Zhang, Y., Xu, H., Li, Y., Zi, X., Yu, H., Li, J., Jin, C.Y. e Liu, H.M., (2016). A new brominated chalcone derivative suppresses the growth of gastric cancer cells *in vitro* and *in vivo* involving ROS mediated up-regulation of DR5 and 4 expression and apoptosis. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **309**, 77–86. Disponível em: doi: 10.1016/j.taap.2016.08.023

Zheoat, A.M., Alenezi, S., Elmahallawy, E.K., Ungogo, M.A., Alghamdi, A.H., Watson, D.G., Igoli, J.O., Gray, A.I., de Koning, H.P. e Ferro, V.A., (2021). Antitrypanosomal and Antileishmanial Activity of Chalcones and Flavanones from *Polygonum salicifolium*. *Pathogens*. **10**(2), 175. Disponível em: doi: 10.3390/pathogens10020175

Anexo C. Artigo 2 (Brief Report) em fase de submissão à revista Journal of Antimicrobial Therapy (JAC).

Mechanism of action of novel brominated chalcone E-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETHOXY-5-METHOXYPHENYL)PROP-2-EN-1-ONE on *Leishmania braziliensis*

Francisnaira da Silva Santos^{1,2*}, Gleice Rayanne Silva,³ Laísia Alonso Uzêda^{1,2}, Fernando Leite Ferreira³, Felipe Sarmiento Guerra³, Luís Cesar Rodrigues³, Hemerson Iury Ferreira Magalhães³, Francisco Jaime Bezerra Junior Mendonça³, Milena Botelho Pereira Soares^{2,4}, Elisalva Teixeira Guimarães^{1,2*}

¹Laboratório de Histotécnica e Cultura Celular, Departamento de Ciências da Vida Universidade Do Estado da Bahia (UNEB), Salvador, Bahia, Brazil

²Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia, Instituto Gonçalo Moniz Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brazil

³Laboratório de Química Orgânica, Departamento de Ciências Farmacêuticas Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João Pessoa, Paraíba, Brazil

⁴Instituto Senai de Inovação Em Sistemas Avançados Em Saúde, SENAI/CIMATEC Salvador, Bahia, Brazil

Short running title: Mechanism of action of FERAI against *Leishmania braziliensis*.

***Corresponding author:** Elisalva Teixeira Guimarães; Telephone:55-71-3117-2200, Email: etguimaraes@uneb.br

Abstract

Background: Chalcones present a potential as bioactive agents due to their simple structure and possibility of generating more active molecules through strategic structural changes. In a previous study, our research group evaluated the in vitro antileishmanial activity of (E)-1-benzo [d][1,3] dioxol-5-yl)-3-(3bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (FERAI) against *Leishmania braziliensis* promastigotes and amastigotes. This study aimed to investigate the mechanisms of action of this molecule in *L. braziliensis* parasites.

Methods: Ultrastructural changes were analyzed by scanning or transmission electron microscopy. Membrane mitochondrial potential, ROS production and cell death pattern were evaluated by flow cytometry.

Results: Ultrastructural analysis by scanning electron microscopy demonstrated morphological alterations in promastigotes, such as cell body retraction and plasmatic membrane lysis. Lipid inclusions, mitochondrial changes, nuclear swelling and flagellar loss was observed by transmission electron microscopy. FERAi induced mitochondrial membrane depolarization, an increase in ROS production, and a pattern of cell death by apoptosis in *L. braziliensis* promastigotes. The combination of FERAi and amphotericin B, a reference drug in the pharmaceutical industry, revealed a synergistic effect against this parasite.

Conclusions: Elucidation of the mechanisms of action demonstrate the importance of FERAi as a promising alternative in the development of drugs against leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis, chalcones, antileishmania, mechanism of action

Introduction

The diversity of species and their several clinical aspects are some of the main challenges for the treatment and prophylaxis of the leishmaniasis. Since 1960, the first choice pharmacological treatment for all types of clinical manifestations of leishmaniasis consists of the use of pentavalent antimonials. These are effective drugs, but the high toxicity has a negative impact on the access to this drug therapy. In cases of contraindications or resistance to antimonials, second-line drugs such as amphotericin B, paromomycin and pentamidine are used as therapeutic alternatives. These drugs also have limitations as highcost, risk of teratogenicity, painful administration and need for hospitalization.¹

The numerous limitations of pharmacological therapy for the various clinical presentations of leishmaniasis, associated with the resistance of the parasite and the low investment in drug research for NTDs demonstrate the urgency in the development

of new antileishmanial compounds. In this perspective, several isolated substances have demonstrated promising bioactive properties, such as flavonoids.²

Natural and synthetic chalcones are bioprecursors of flavonoids, with a relatively simple structure and pharmacological activities already reported in the literature, as antioxidant, antiparasitic, immunomodulatory and anti-inflammatory.^{3,4} In a previous study, our research group evaluated the *in vitro* antileishmanial activity of the synthetic chalcone (E)-1-benzo [d] [1,3]dioxol-5-yl)-3-(3bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl) prop-2-en-1-one, FERAI (in press). This molecule showed low cytotoxicity, reduced proliferation of promastigotes and inhibited infected macrophages. This study intends to investigate the possible biochemical targets of the parasite affected after the treatment of *L. braziliensis* with FERAI.

Methods

Parasites and drugs

L. braziliensis promastigotes (MHOM/BR88/BA-3456) were cultured in Schneider medium (Sigma, St. Louis, MO, United States) containing 10% fetal bovine serum (FBS, GIBCO, ThermoFisher scientific, Waltham, MA USA), 50 µg/mL gentamicin (Life, Carlsbad, CA), pH 7.2, incubated at 26°C. Parasites were counted daily in a Neubauer chamber for five days. When they reached the stationary growth phase, new *in vitro* passages were performed. The (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5 methoxyphenyl)prop-2-en-1-one (FERAI) was synthesized by the Organic Chemistry Laboratory of the Federal University of Paraíba, Brazil, and kindly provided by Dr. Luís Cezar Rodrigues to our research group. Amphotericin (GIBCO BRL Life Technologies, Grand Island, NY, USA) was used as a positive control.

Scanning Electron Microscopy

L. braziliensis promastigotes (1×10^7) were treated with two concentrations of FERAI (5 and 10 µM) for 24 hours at 26°C. The parasites were fixed in a 2% glutaraldehyde solution and 0.1 M sodium cacodylate buffer for 2 hours at room temperature. After fixation, the samples were marked with a solution containing 1% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer, for 1 hour, at room temperature. The parasites were placed on glass coverslips with 0.01% poly-L-lysine, dehydrated

with an ethanol series (30 to 100%) and submitted to the critical point (replacement of ethanol by CO₂). The samples were then metallized with gold and observed in a JEOL JSM-6390LV scanning electron microscope.

Transmission Electron Microscopy

L. braziliensis promastigotes (3×10^6 /well) were treated with FERAI (5 and 10 μ M) for 24 hours and incubated at 26°C. Parasites were fixed for 1 hour at room temperature with 2% v v⁻¹ formaldehyde and 2.5% v v⁻¹ glutaraldehyde (electron microscopy sciences, hatfield, pa, usa) in sodium cacodylate buffer (0.1 m, ph 7.2). After fixation, the parasites were washed 4 times with 0.1 mm sodium cacodylate buffer, ph 7.2, and fixed with 1% osmium tetroxide solution (Sigma chemical co., st. louis, mo, usa). Parasites were subsequently dehydrated in increasing concentrations of acetone (30, 50, 70, 90 and 100%) for 10 minutes at each stage, embedded in polybed 29 resin (polyscience family, warrington, pa, usa). Ultrathin sections were prepared on an ultramicrotome (leica uc7) and sections were collected on 300 mesh copper grids, counterstained with uranyl acetate and lead citrate. Images were collected using a jeol tem-1230 transmission electron microscope.

Cell death pattern

The potential of FERAI to induce apoptosis or necrosis was evaluated by Annexin V and Propidium Iodide (PI) test. *L. braziliensis* promastigotes (1×10^6) were added to 24-well plates containing Schneider medium, with or without FERAI at 5 and 10 μ M or amphotericin B at 3 μ M, and incubated for 48 hours at 26°C. After this period, the parasites were transferred to cytometry tubes, washed twice with 1mL of PBS at 3000 RPM for 5 minutes, resuspended in 100 μ L of Annexin-V binding buffer (HEPES/NaOH at 10 mM, pH 7.4; 140 mM NaCl; 2.5 mM CaCl₂) and labeled with 5 μ L of Annexin-V (BioSource, Camarillo, CA, USA) for 15 minutes, in the absence of light. Subsequently, 400 μ L of Annexin-V binding buffer and 10 μ L of Propidium Iodide (BioSource) were added. Data was acquired using a BD LSRFortessa flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, United software Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, USA).

Mitochondrial Membrane Potential Analysis

L. braziliensis promastigotes (1×10^6 /well) were treated with 5 and 10 μM of FERAI for 72 hours. After this treatment, the parasites were incubated with 10 $\mu\text{g/mL}$ of rhodamine 123 (Sigma Aldrich, St. Louis USA) for 15 minutes. Cells treated with 3 μM methanol for 30 minutes were used as a negative control. Data was acquired using a BD LSRFortessa flow cytometer (Becton Dickinson Biosciences, San Jose, CA, United States) 10,000 events were acquired and the data was analyzed by the software Flowjo v10. 6.1 (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, EUA).

Reactive oxygen species

L. braziliensis promastigotes (2×10^6 per well) were cultured in a 24 well plate in Schneider medium, supplemented with 10% fetal bovine serum and 50 $\mu\text{g/mL}$ of gentamicin and subjected to treatment with different concentrations (5 μM to 20 μM) of FERAI. The parasites were incubated for 4 hours at 26°C . The wells were then washed three times with saline solution. Subsequently, 6 μL of H_2DCFDA (dichlorodihydrofluorescein diacetate) was added per well (10mM) (Invitrogen, Eugene, USA), and kept for 30 minutes in the absence of light. Data was acquired using a BD LSRFortessa flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using the FlowJo v10.6.1 software (Becton, Dickinson and Company, Ashland, OR, USA).

Statistical analysis

The significance of differences between groups was assessed using the one-way ANOVA and the Newman Keuls multiple comparison post-test for sample group or analysis of variance. The critical significance limit was established for $p \leq 0.1$.

Results

FERAI induces apoptosis in *L. braziliensis*: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation

To assess the mechanism by which FERAI could cause parasite death, promastigotes were treated with FERAI for 24 hours and stained with Annexin-V-FITC and propidium iodide (PI). Untreated cells were Annexin-V and PI negative, demonstrating cell viability (Figure 1A). Promastigotes were positive only for Annexin-V when treated with 5 μM (19.2%) or 10 μM (21.1%) of FERAI (Figure 1C and 1D) and with 3 μM (18.2%) of amphotericin B (Figure 1B). These data suggest that FERAI-

treated promastigotes were in early stages of apoptosis-like death (Figure 1E). In addition, in order to better elucidate the pathways that lead to cell death by apoptosis, mitochondrial depolarization potential and ROS production after *L. braziliensis* treatment with FERAI was evaluated by flow cytometry. Rhodamine 123 intensity was significantly reduced after incubation with FERAI in all tested concentrations: 63.9% for FERAI at 5 μ M and 77.6% for FERAI at 10 μ M, as observed for methanol, the positive control of mitochondrial depolarization (Figure 1F). Moreover, FERAI induced increased ROS compared to the untreated control. Hydrogen peroxide (H_2O_2) was used as a positive control of this production (Figure 1G).

Ultrastructural changes in the parasite after treatment with FERAI

Initially, ultrastructural analysis by scanning electron microscopy (SEM) or transmission electron microscopy (TEM) was used to evaluate the morphology of *L. braziliensis* promastigotes treated or not with FERAI. Untreated promastigotes had an elongated shape and a long flagellum. No visible changes in the cell size or membrane was observed (Figure 2A). Mitochondria, nucleus, kinetoplast, and flagellar pocket were well preserved (Figure 2D). In contrast, parasites treated for 48 hours with FERAI at 5 μ M presented loss of the elongated shape, bulging, retraction of the cell body (Figure 2B), and intracytoplasmic lipid inclusions (Figure 2E). Cell membrane lysis, content overflow (Figure 2C), changes in mitochondrial morphology, and nuclear swelling (Figure 2F) were observed in promastigotes treated with FERAI at 10 μ M. In addition, parasites demonstrated flagellar loss at both concentrations evaluated by TEM (Figures 2E and 2F).

Discussion

Flavonoids are biosynthetic compounds found in plants with proven action in health research. Chalcones, bioprecursors of flavonoids, have a vast number of activities described in the literature, such as antitumor, antiparasitic and anti-inflammatory.^{3,4} The activity of chalcones has been widely investigated against parasitic protozoa, with promising results. Regarding leishmaniasis, the results include potent *in vitro* and *in vivo* activity against *L. donovani*, *L. braziliensis* and *L. panamensis*.⁴ Due to its structural simplicity, chalcone derivatives and their bioactivity have been described in the literature.⁵

In previous study, our group demonstrated that bromine addition in the FERAI structure optimizes leishmanicidal effect against promastigotes and amastigotes forms of *L. braziliensis* (article in press). Brominated synthetic substances increase the activity of therapeutic agents, although the mechanisms that explain activity are not yet fully elucidated. Several possibilities are suggested as lipophilicity and permeability through biological membranes increased.⁶

Analysis by flow cytometry showed that apoptosis was the cell death mechanism triggered by FERAI on *L. braziliensis* promastigotes. Apoptosis is crucial in the context of the host immune response and relevant to the development of tissue homeostasis in multicellular organisms. In trypanosomatids therapy, programmed cell death is advantageous to regulate the parasite density in the host avoiding hyperparasitism.⁷

Ultrastructural changes observed by electron microscopy demonstrate direct action of FERAI on parasite. Ultrastructural and morphological changes in *L. braziliensis* promastigotes after treatment with synthetic chalcone also were observed by De Melo *et al* (2008). The authors observed the loss of cell morphology, shrinkage and deformation of the cell body, corroborating the results founded in this paper. Furthermore, alterations in organelles as nuclear dilation and loss of mitochondrial morphology are characteristics associated with cell death induced by apoptosis, ratifying our data.⁸

The mitochondria play an important role in cell death by apoptosis. Modifications in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) can be seen as one of the consequences of apoptosis or even as an initial requirement for it to occur. Leishmania presents a large and single mitochondria, which is responsible for most of the energy supply, playing an essential role for parasite survival. This organelle has become a potential target for the development of new therapeutic agents.⁹ FERAI alters membrane potential in *L. braziliensis* promastigotes, suggesting that the action of the compound is dependent of this pathway.

Changes in the $\Delta\Psi_m$ of leishmania parasites can be associated with increased generation of reactive oxygen species (ROS). ROS are a limiting factor for the survival of leishmania inside the parasitophorous vacuole, due to the generation of cellular stress and consequent lipid peroxidation, which influences the fluidity of the mitochondrial membrane and the loss of $\Delta\Psi_m$.¹⁰ FERAI significantly increases the production of reactive oxygen species. This data corroborates our previous results and

other studies demonstrating that some chalcones manage to trigger apoptosis by ROS production. Chalcones can motivate the opening of mitochondrial channels, and trigger a collapse in the mitochondrial membrane of the parasite.¹⁰

Collectively, these data suggest a central role of ROS generation, mitochondrial depolarization, direct damage to the parasite with subsequent programmed cell death as important mechanisms of action of FERAI against *L. braziliensis* promastigotes. This brominated chalcone may be a promising therapeutic alternative in the treatment of leishmaniasis.

Acknowledgements

We thank the University of the State of Bahia and the Graduate Program in Pharmaceutical Sciences for the institutional support, as well as the Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) Bahia-BR for the instrumental and technological support.

Funding

This work was supported by CNPq – National Council for Scientific and Technological Development – CNPq.

Transparency declarations

The authors state that the research was conducted in the absence relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- 1 Tiwari N, Gedda M, Tiwari V. K *et al.* Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. *Mini Reviews in Medicinal Chemistry* 2018; **18**: 26-41.
- 2 Mathew E, Vinuth S, Joe H *et al.* Third-order nonlinear optical studies of two novel chalcone derivatives using Z-scan technique and DFT method. *Optics & Laser Technology*, v. 120, p. 105697, 2021
- 3 Vanangamudi G, Subramanian M, Thirunarayanan G. *et al.* Spectral linearity, antimicrobial, antioxidant and insect antifeedant activities of some 2,5-dimethyl-3-thienyl chalcones. *Arabian Journal of Chemistry* 2017; **10**:1257.

- 4 Gupta S, Rahul S, Venkateswarlu K, *et al.* Synthesis and biological evaluation of chalcones as potential antileishmanial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; **81**:359-66.
- 5 Liu M, Yin H, Liu G, *et al.* Xanthohumol, a prenylated chalcone from beer hops, acts as an α -glucosidase inhibitor *in vitro*. *J. Agric. Food Chem* 2014; **62**:5548–54.
- 6 Jitareanu A, Agoroaei L, Cezara I. Halogenation-A Versatile Tool For Drug Synthesis-The Importance Of Developing Effective And Eco-Friendly Reaction Protocols. *Current Analysis on Biotechnolog* 2019;2:11-25.
- 7 Galluzzi L, Vitale L, Aaronson AS, *et al.* Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Official journal of the Cell Death Differentiation Association* 2018; **25**: 486-41. <https://doi.org/s41418-017-0012-4>
- 8 De Mello, Palmeira V, *et al.* A comprehensive review of chalcone derivatives as antileishmanial agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 150, p. 920-929, 2018.
- 9 Gottlieb E, Armour SM, Harris MH, *et al.* Mitochondrial membrane potential regulates matrix configuration and cytochrome c release during apoptosis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2003; **10**:709-17
<https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401231>.
- 10 Zorov DB, Juhaszova M, Sollott S. J. Mitochondrial ROS-induced ROS release: An update and review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Bioenergetics*, 2006 :509-517, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.029>.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Mechanisms of action of FERAI in *L. braziliensis* promastigotes by flow cytometry. (A, B, C, D) Pattern of cell death. (A) Untreated promastigotes; (B) promastigotes treated with 3 μ M AMB; (C) promastigotes treated with 5 μ M FERAI; (D) promastigotes treated with 10 μ M FERAI. (F) Mitochondrial membrane potential. (G) ROS intracellular production. Representative values of means $\pm$ SD of three determinations obtained in two experiments. *** $P < 0.001$, ns= not significant compared to untreated control.

Figure 2. Ultrastructural changes in *L. braziliensis* promastigotes after treatment with FERAI. (A, B and C) Scanning electron microscopy; (D, E and F) Transmission electron microscopy. Untreated promastigotes (A and D), treatment with 5 μ M of FERAI (B and E) and treatment with 10 μ M of FERAI (C and F). flagellum (f); flagellar pocket (fp); mitochondria (m); nucleus (n); *lipid vacuoles.

FIGURE 1

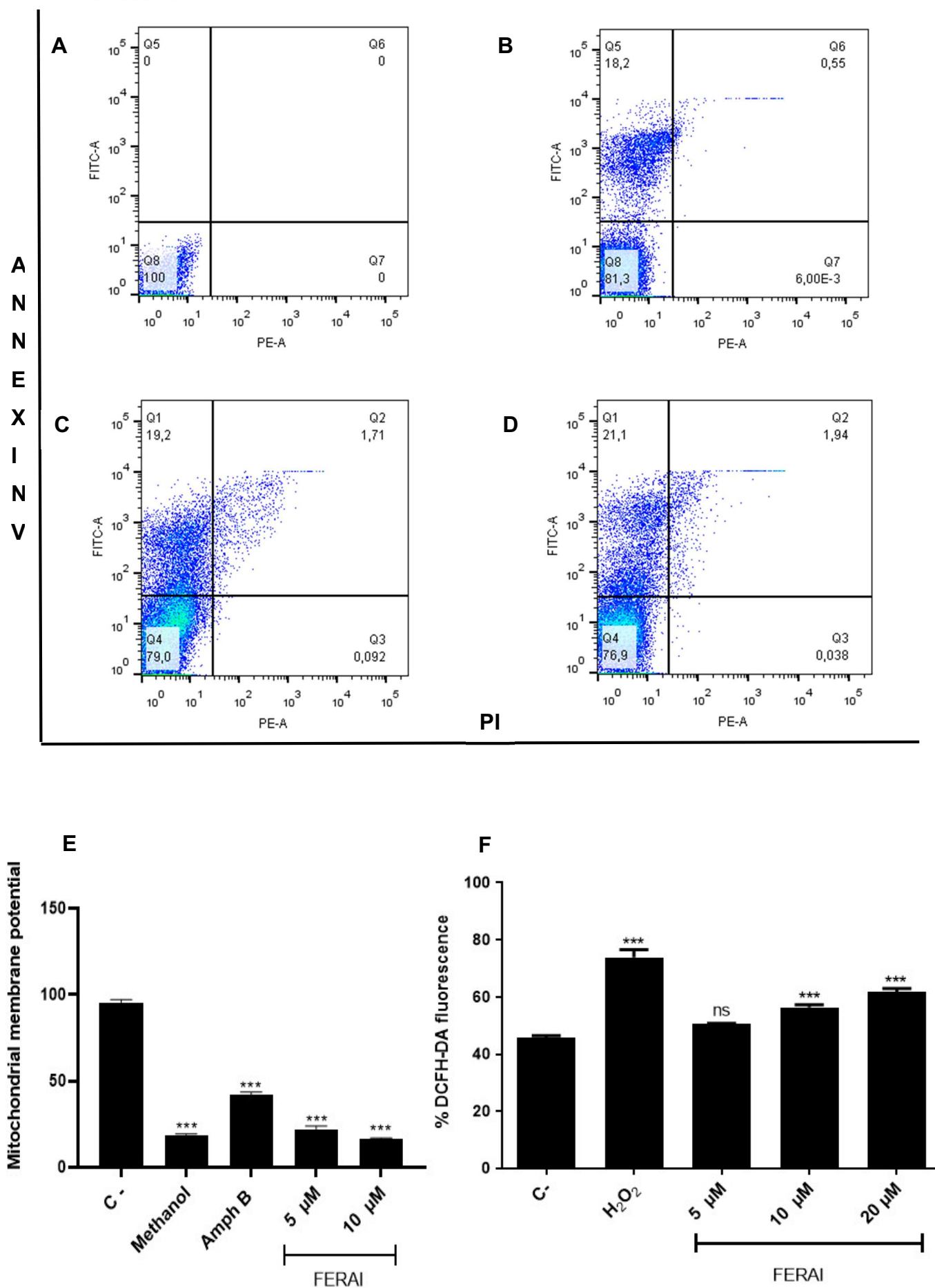


FIGURE 2

