



**UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
COLEGIADO DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**

**EFEITO IMUNOMODULADOR DA CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-
IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA EM
MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania braziliensis***

BEATRIZ CERQUEIRA DOS SANTOS

Salvador – Bahia

2024

UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
COLEGIADO DE FARMÁCIA
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

**EFEITO IMUNOMODULADOR DA CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-
IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA EM
MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania braziliensis***

BEATRIZ CERQUEIRA DOS SANTOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Colegiado de Farmácia para obtenção do grau de
bacharelado em farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dra. Elisalva Teixeira Guimarães

Co-orientadora: MSc. Laísia Falcão Alonso Uzêda

Salvador – Bahia

2024


FOLHA DE APROVAÇÃO

BEATRIZ CERQUEIRA DOS SANTOS


EFEITO IMUNOMODULADOR DA CHALCONA (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA EM MACRÓFAGOS INFECTADOS POR *Leishmania braziliensis*

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Colegiado de Farmácia, em 16 de dezembro de 2024, como requisito para obtenção do grau de bacharelado em farmácia, pela Universidade do Estado da Bahia (UNEB).

BANCA EXAMINADORA:

 Documento assinado digitalmente
ELISALVA TEIXEIRA GUIMARAES
Data: 18/12/2024 11:14:14-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Profa. Dra. Elisalva Teixeira Guimares – Orientadora – UNEB

 Documento assinado digitalmente
WALKER NONATO FERREIRA OLIVEIRA
Data: 16/12/2024 15:25:45-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. Dr. Walker Nonato Ferreira Oliveira – Membro interno – UNEB

 Documento assinado digitalmente
DAHARA KEYSE CARVALHO SILVA
Data: 16/12/2024 17:06:37-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Prof. MSc. Dahara Keyse Carvalho Silva – Membro externo

Salvador – Bahia

2024

AGRADECIMENTOS

Primeiro, gostaria de agradecer a Deus, sem Ele, eu não teria chegado até aqui. Sem Ele, eu não teria tido forças para enfrentar todas as dificuldades que surgiram no meio do caminho (e não foram poucas). Só Ele viu todas as lágrimas que derramei e ouviu minhas orações nos momentos de desespero, e ainda que esses momentos tenham existido, Ele conseguiu me manter grata. Grata à vida que me foi dada, e grata pela oportunidade de poder recomeçar sempre que for necessário, todos os dias. Toda pedra no caminho dessa graduação e desse trabalho me tornaram uma pessoa mais forte.

Aos meus pais, Simone e David, vocês são responsáveis pela minha existência, e eu não sei se sou capaz de expressar em palavras o quanto eu amo vocês. Sei de todo esforço que vocês fizeram toda a minha vida para me proporcionar tudo que me foi dado, reconheço em cada ação, todos os detalhes, e sou capaz de sentir o amor de vocês por mim. Bruna, minha irmãzinha, eu sei que você ficou triste por um tempo quando soube que eu era uma menina, só porque você queria um irmão (risos), mas não se preocupe, eu tenho sentido todo amor e cuidado vindo de você há 24 anos, eu te amo muito (do meu jeitinho). Obrigada pela paciência nos meus momentos difíceis, vocês são as pessoas mais importantes da minha vida.

À minha família e aos meus amigos, vocês foram fundamentais nesse processo. Ter o apoio, a compreensão e o respeito de vocês nos momentos que eu mais precisava fizeram toda a diferença. Nos momentos de lazer, mas principalmente naqueles momentos em que eu precisei estar ausente. Não preciso nomeá-los, vocês sabem que são vocês. Amo vocês, muito obrigada!

Aos meus “Farmamigos”, em especial à Beatriz, Camila e Carolina, vocês foram, sem dúvida, a melhor coisa que a UNEB me proporcionou. Nossa união, um tanto quanto inesperada, trouxe alegria aos meus dias, poder contar com vocês em todos os momentos tornaram essa jornada mais leve e eu já estou com saudade de viver isso tudo com vocês. Ana Beatriz, Ana Luiza, Carla, Ícaro e Rebeca, jamais me esquecerei de todas as vezes que eu chorei de tanto rir com vocês, esses 6 anos não teriam sido o mesmo sem vocês. Vocês são incríveis, obrigada por tudo!

À minha orientadora, Elisalva, que há 4 anos mudou o rumo da minha graduação e me deu a oportunidade de viver a pesquisa. Liu, obrigada por ter me

ensinado tanto, você me proporcionou crescimento acadêmico, mas principalmente crescimento pessoal, seu incentivo e seus puxões de orelha foram essenciais. Ver o amor que você entrega no que você faz me inspira!

Ao GEPPE e todas as meninas que passaram por ele e compartilharam conhecimentos comigo. Catarina, Laísia, Rebeca e Yalla, vocês merecem um obrigada especial porque esse trabalho não teria existido sem a ajuda vocês, literalmente!

À todos que não foram citados mas fizeram parte desse processo de alguma forma, muito obrigada!

Por fim, à UNEB, a FIOCRUZ e as instituições de fomento, responsáveis por tornarem esse trabalho possível.

Depois do medo, vem o mundo.

- Clarice Lispector

RESUMO

Introdução: A leishmaniose é um problema de saúde pública mundial. A infecção acontece através das mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, tendo o flebotomíneo (mosquito-palha) como vetor. O desenvolvimento da doença depende do estado nutricional e da resposta imune do indivíduo, além da espécie do parasito envolvido na infecção. Classicamente, os macrófagos infectados por estes parasitos apresentam duas vias de modulação imunológica, uma direcionada para a cura do indivíduo, e outra pelo desenvolvimento da doença. Os tratamentos existentes para a doença possuem diversas limitações associadas, corroborando para necessidade de novas opções de tratamento. As chalconas, compostos pertencentes à classe dos flavonoides, têm despertado interesse científico pelas diversas atividades biológicas que apresentam. **Objetivo:** Investigar o papel da chalcona (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (FERAI) em modular a resposta imunológica *in vitro* de macrófagos ativados por lipopolissacarídeo e pela infecção por *L. braziliensis*. **Materiais e métodos:** A chalcona em estudo foi sintetizada pelo grupo liderado pelo Prof. Hemerson Iuri da Universidade Federal da Paraíba – UFPB. A avaliação da citotoxicidade foi realizada em macrófagos murinos, após o tratamento destes com diferentes concentrações do FERA. A dosagem de citocinas e NO foi realizada no sobrenadante de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e/ou estimulados por lipopolissacarídeo e tratados com diferentes concentrações do FERA. **Resultados:** O FERA possui baixa citotoxicidade. A produção de NO foi aumentada após 24h de tratamento com FERA, quando comparada aos grupos não tratados. Uma inibição das citocinas pró-inflamatórias TNF- α (após 4 horas) e IL-1 β , IL-6 e IL-12 (após 48 horas) foi observada nos grupos tratados com FERA, além do aumento da produção de importante citocinas anti-inflamatórias, a IL-10 e o TGF- β (após 48 horas), especialmente na concentração de 10 μ M. **Considerações finais:** Os resultados desse estudo sugere que o FERA é capaz de modular a resposta imunológica frente à infecção por *L. braziliensis*.

Palavras-chave: Resposta imune; chalcona; macrófago; *Leishmania*

ABSTRACT

Introduction: Leishmaniasis is a global public health problem. Infection occurs through more than 20 species of protozoa of the genus *Leishmania*, with the sand fly (straw mosquito) as the vector. The development of the disease depends on the individual's nutritional status and immune response, in addition to the species of parasite involved in the infection. Classically, macrophages infected by these parasites present two pathways of immunological modulation, one directed towards curing the individual, and the other towards the development of the disease. Existing treatments for the disease have several associated limitations, supporting the need for new treatment options. Chalcones, compounds belonging to the flavonoid class, have aroused scientific interest due to the different biological activities they present.

Objective: Investigate the role of the chalcone (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-yl)-3-(3-bromo-4-ethoxy-5-methoxyphenyl)prop-2-en-1-ona (FERAI) in modulating the in vitro immune response of macrophages activated by lipopolysaccharide and *L. braziliensis* infection.

Materials and methods: The chalcone under study was synthesized by the group led by Prof. Hemerson Iuri from the Federal University of Paraíba – UFPB. The evaluation of cytotoxicity was carried out in murine macrophages, after treating them with different concentrations of FERA. The measurement of cytokines and NO was carried out in the supernatant of macrophages infected by *L. braziliensis* and/or stimulated by lipopolysaccharide and treated with different concentrations of FERA.

Results: FERA has low cytotoxicity. NO production was increased after 24h of treatment with FERA, when compared to untreated groups. An inhibition of the pro-inflammatory cytokines TNF- α (after 4 hours) and IL-1 β , IL-6 and IL-12 (after 48 hours) was observed in the groups treated with FERA, in addition to an increase in the production of important anti-inflammatory cytokines. inflammatory diseases, IL-10 and TGF- β (after 48 hours), especially at a concentration of 10 μ M.

Final considerations: The results of this study suggest that FERA is capable of modulating the immunological response to *L. braziliensis* infection.

Keywords: Immune response; chalcone; macrophage; *Leishmania*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APC: Célula apresentadora de antígeno (do inglês *Antigen Presenting Cells*)

CC₅₀: Concentração citotóxica para 50%

DMEM: Eagle modificado por Dulbecco (do inglês *Dulbecco's modified Eagle's medium*)

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucléico (do inglês *Deoxyribonucleic acid*)

IFN- γ : Interferon gama

IL: Interleucinas

IL-1 β : Interleucina 1 beta

IL-6: Interleucina 6

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

LC: Leishmaniose Cutânea

LCD: Leishmaniose Cutânea Difusa

LD: Leishmaniose Disseminada

LMC: Leishmaniose Muco-cutânea

LPS: Lipopolissacarídeo

LT: Leishmaniose Tegumentar

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

M1: Perfil M1 (via clássica) de ativação dos macrófagos

M2: Perfil M2 (via alternativa) de ativação dos macrófagos

NK: Células *natural killer*

NO: Óxido Nítrico (do inglês *Nitric Oxide*)

OMS: Organização Mundial da Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

PCR: Reação em cadeia da polimerase (do inglês *Polymerase Chain Reaction*)

ROS: Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*)

SBF: Soro bovino fetal

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

TGF- β : Fator de crescimento transformador beta (do inglês *Transforming growth factor beta*)

Th: T helper (Linfócito T auxiliar)

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa (do inglês *Tumoral Necrosis Factor*)

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 1: Manifestações clínicas

Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania*

Figura 3: Resposta imune inata e adaptativa

Figura 4: Vias de ativação de macrófagos

Figura 5: Resposta imune frente à *Leishmania*

Figura 6: Representações estruturais e numéricas da chalcona

Figura 7: Alterações ultraestruturais do FERAI em promastigonas de *L. braziliensis*

Figura 8: Estrutura Química do FERAI (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona

Figura 9: Produção de TNF- α e NO em macrófagos murinos tratados com FERAI

Figura 10: Produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos tratados com FERAI

Figura 11: Produção de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos murinos tratados com FERAI

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1: Citotoxicidade do FERAI frente à macrófagos murinos

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJETIVOS	16
2.1 GERAL	16
2.2 ESPECÍFICOS	16
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
3.1 A LEISHMANIOSE	17
3.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO	18
3.3 RESPOSTA IMUNE	19
3.4 IMUNOMODULAÇÃO NA INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i>	21
3.5 TRATAMENTO	23
3.6 CHALCONAS	25
3.7 FERAI	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1 O FERAI	28
4.2 CULTURA DE CÉLULAS E PARASITOS	28
4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	29
4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO	29
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 O FERAI POSSUI BAIXA CITOTOXIDADE	31
5.2 PRODUÇÃO DE TNF- α e NO APÓS O TRATAMENTO OU NÃO DE MACRÓFAGOS COM FERAI	32
5.3 FERAI INIBE A PRODUÇÃO DE OUTRAS CITOCINAS PRÓ- INFLAMATÓRIAS	34
5.4 PRODUÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS	37
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
REFERÊNCIAS	41

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é um problema de saúde pública mundial. A doença é endêmica e negligenciada, e acomete principalmente países subdesenvolvidos, tropicais e subtropicais, o que inclui o Brasil. A infecção acontece através das mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, tendo o flebotomíneo (mosquito-palha) como principal mosquito vetor (OPAS,2022).

O desenvolvimento da doença depende do estado nutricional e da resposta imune do indivíduo, podendo possuir diferentes manifestações clínicas, a depender das diferentes espécies de protozoários envolvidas, como também das diferenças genéticas dentro de uma mesma espécie. São elas: a Leishmaniose Tegumentar (LT), subdividida em Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Muco-cutânea (LMC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD), essas apresentações são caracterizadas pelas ulcerações na pele, sendo a LMC a apresentação mais debilitante, que afeta as mucosas da boca, nariz e faringe, essas manifestações estão associadas, principalmente, as espécie *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*; além dessas, existe a Leishmaniose Visceral (LV), forma mais grave da doença, potencialmente fatal, que acomete órgãos como fígado, baço, linfonodos e medula óssea, associada as espécies *Leishmania infantum chagasi*, *Leishmania donovani* (Neves *et al.*, 2005; Rey, 2010; Siqueira-Batista, 2020).

A Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) relataram em 2022 que 99 países são endêmicos para doença, sendo dezenove endêmicos para LC, nove endêmicos para LV, e 71 endêmico para ambos. Além disso, mais de um milhão de novos casos são relatados por ano, e estima-se que cerca de um bilhão de pessoas estejam vivendo em área de risco, sendo expostas à possíveis infecções (OMS,2022).

Os tratamentos existentes para a doença possuem diversas limitações associadas, dentre elas podem ser citadas: as vias de administração dolorosa (intramuscular e intravenosa) e o potencial tóxico, o que requer monitoramento terapêutico cauteloso e hospitalização na maioria dos casos. Além disso, esses medicamentos possuem elevadas taxas de recidivas, resistência parasitária e custo elevado, com tratamentos variando entre R\$661,45 e R\$2.822,13 por paciente (Carvalho *et al.*, 2021). Todas essas questões corroboram para necessidade de novas opções de tratamento para a doença, sendo a busca de novas opções provenientes

de produtos naturais e sintéticos, como alternativa com melhor custo-benefício e menos efeitos colaterais associados (Santiago *et al.*, 2021; Magalhães *et al.*, 2022).

As chalconas são compostos pertencentes à classe dos flavonoides. Elas apresentam relevância científica pelas atividades biológicas que vem sendo descritas na literatura, como a antioxidante, a anti-inflamatória, a antitumoral, a antimicrobiana, a antiviral e a antiparasitária (Castaño *et al.*, 2019; Singh *et al.*, 2019). O nosso grupo de pesquisa tem demonstrado importante atividade antileishmania 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, em testes *in silico* e *in vitro* (Silva *et al.*, 2023). Neste trabalho, a modulação da resposta imunológica em macrófagos infectados por *L. braziliensis* e/ou estimulados com LPS e tratados com o FERAI foi avaliada.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar o papel da chalcona (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona (FERAI) em modular a resposta imunológica *in vitro* de macrófagos ativados por lipopolissacarídeo e pela infecção por *L. braziliensis*.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar a citotoxicidade do composto em estudo;
- Determinar o perfil de produção de óxido nítrico e citocinas após o tratamento com o FERA1 de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e/ou estimulados com LPS.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 A LEISHMANIOSE

A leishmaniose é uma doença prevalente em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com pouco investimento em tratamento. Afeta principalmente os continentes africano, asiático e a América Latina, sendo a *L. braziliensis* uma das espécies mais importantes e prevalentes da América Latina, no Brasil e na Bahia (OMS, 2022). Esta enfermidade infecciosa não é contagiosa e tem caráter zoonótico, isto é, doença originada de animais que são transmitidas a humanos. A transmissão ocorre através da picada do flebotomíneo fêmea, e acomete o homem (hospedeiro acidental) e diversas espécies de animais silvestres (roedores) e domésticos, principalmente cães, reservatórios urbanos de parasitos que desenvolvem a LV (De Mello *et al.*, 2014; Sarmiento *et al.*, 2021).

A LV tem caráter sistêmico, de curso crônico, grave, e de alta letalidade se não tratada, apresenta principalmente hepatoesplenomegalia, podendo aparecer febres irregulares de intensidade média e de longa duração, acompanhada de diversas alterações hematológicas, principalmente, anemia, leucopenia e trombocitopenia. Associado a isso, o emagrecimento, o edema e o estado de debilidade progressiva contribuem para agravamento dos casos e o óbito (Rey, 2010; Brasil, 2014).

A LT tem ampla prevalência e apresenta amplo espectro clínico, nas Américas Central e do Sul, é chamada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), relacionada as manifestações LC, LMC e a LCD. A LC é uma doença benigna que pode se apresentar por lesões indolores simples ou múltiplas, com bordas altas, delimitadas, e bem definidas. Tem caráter expansivo e tendência de disseminação para áreas distantes do ponto de penetração, cursando com o aparecimento de novas lesões. A LMC pode surgir como uma complicação da LC, podendo aparecer, meses e até mesmo anos após o aparecimento da primeira manifestação de LC, culminando com o aparecimento de lesões ulcerosas agressivas e destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe. O processo ulcerativo pode atingir os lábios e se espalhar por todo o rosto, estas graves mutilações podem causar dificuldades de respirar, falar e se alimentar. Além de serem frequentes as complicações respiratórias por infecções secundárias, podem levar o paciente ao óbito. A

LCD, associada a *L. amazonensis*, está relacionada intimamente à deficiência da resposta imune celular e apresenta lesões difusas, não ulcerativas, semelhante a nódulos de queloide, podendo se espalhar por grandes porções do corpo. A LD é uma forma agressiva associada a lesões cutâneas múltiplas e polimórficas em mais de duas regiões do corpo, com aparecimento de pápulas, nódulos superficiais e ulcerações. E apesar de possuir essas manifestações clínicas clássicas, apenas uma pequena parte dos indivíduos infectados vão desenvolver a doença de fato (Brasil, 2017; Costa *et al.*, 2021; Machado *et al.*, 2024).



Figura 1: Manifestações clínicas (Adaptado de Brasil, 2014/2017)

O diagnóstico é clínico e laboratorial, com base na característica da lesão apresentada, associado a anamnese, na qual os dados epidemiológicos são de grande importância. Podem ser realizadas pesquisa direta em esfregaço sanguíneo, pesquisa de DNA do parasito por PCR, e imunoenaios, como o Teste de Montenegro (Brasil, 2014/2017).

3.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO

O ciclo biológico da *Leishmania* é heteroxênico, isto é, possui um hospedeiro invertebrado (mosquito) e um hospedeiro vertebrado (homem). A

infecção se inicia com a inoculação de formas promastigotas metaciclíca (formas infectivas) através do repasto sanguíneo realizado pela picada do flebotomíneo fêmea. Nos tecidos, essas formas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos, e dentro dos macrófagos assumem a forma de amastigotas intracelulares. Essas amastigotas se multiplicam por divisão binária simples dentro dos macrófagos até romper sua parede celular, retornando para os tecidos, e estando disponíveis para serem novamente fagocitada por outros macrófagos ou serem ingeridas através de um novo repasto sanguíneo com o mosquito-palha fêmea. Dentro do intestino do mosquito, esses parasitos sofrem uma nova diferenciação e se tornam promastigotas novamente, que se reproduzem de forma assexuada, podendo realizar uma nova infecção através de outro repasto sanguíneo (Kane & Mosser, 2000).

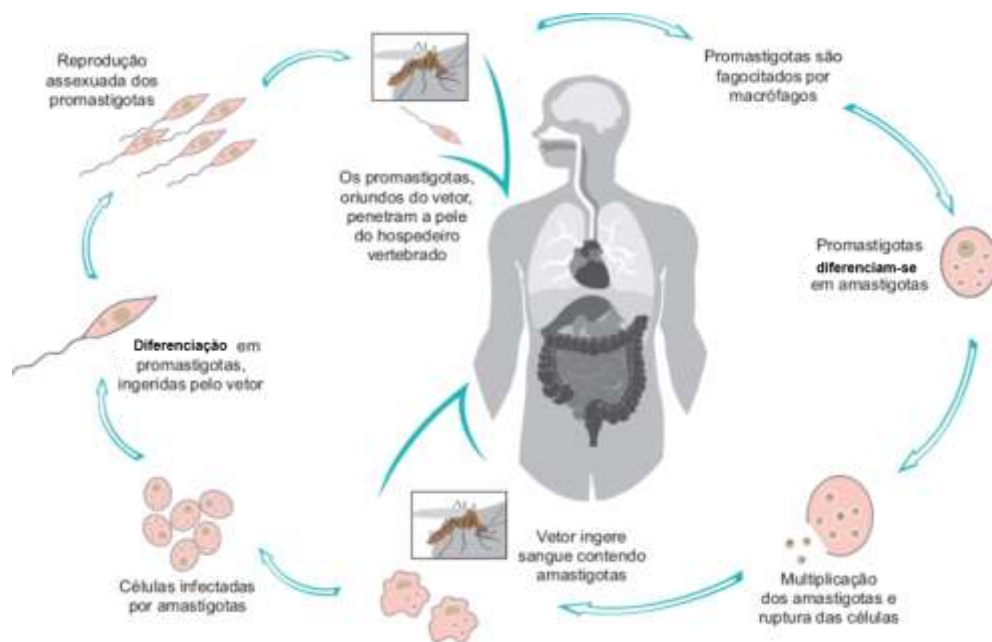


Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania* (Siqueira-Batista, 2020)

3.3 RESPOSTA IMUNE

O sistema imune é responsável pela defesa contra microrganismos infecciosos, as células e moléculas que o constituem e sua resposta coletiva e coordenada à entrada dessas substâncias estranhas é chamada de resposta imune, no entanto, mesmo substâncias estranhas não infecciosas e produtos de células danificadas podem induzir respostas imunológicas. Essas respostas são chamadas de imunidade inata e imunidade adaptativa (Abbas, 2019).

A imunidade inata, também chamada de natural ou nativa, é a desenvolvida nas primeiras horas e nos primeiros dias após a infecção, ela é mediada por mecanismos já existentes antes mesmo da exposição acontecer, por isso ela é responsável por respostas mais rápidas contra os microrganismos invasores. As principais células envolvidas nessa resposta são os fagócitos (macrófagos e neutrófilos), células dendríticas, células *natural killer* (NK), mastócitos e células linfoides inatas, essas células recebem a ajuda de proteínas sanguíneas do sistema complemento e de várias lectinas e aglutininas, tendo a pele, epitélios de mucosas, e moléculas antimicrobianas como barreiras celulares e químicas. No entanto, essa resposta possui memória limitada ou até mesmo inexistente, além de menor especificidade e diversidade, atuando em moléculas compartilhadas por grupos de microrganismos relacionados (Murphy, 2014; Abbas, 2019).

Em contraponto, a imunidade adaptativa, também chamada de específica ou adquirida, são estimuladas pela exposição aos agentes infecciosos, que aumentam em magnitude e capacidade responsiva após exposições sucessivas. Essa resposta reconhece e reage a um grande número de substâncias microbianas e não microbianas, as quais são chamadas de antígenos. As células responsáveis por essa proteção são os linfócitos e sua produção de anticorpos e células T efectoras, eles possuem maior especificidade para os antígenos, e diversidade ampla para uma gama de genes dos receptores formados por recombinação nos linfócitos (Murphy, 2014; Abbas, 2019).

As imunidades inata e adaptativa são conectadas, enquanto a inata fornece os primeiros sinais de perigo que estimulam a resposta imune adaptativa, ela frequentemente trabalha intensificando os mecanismos protetores da imunidade inata, fazendo com que eles sejam cada vez mais capazes de combater efetivamente os microrganismos (Murphy, 2014; Abbas, 2019).

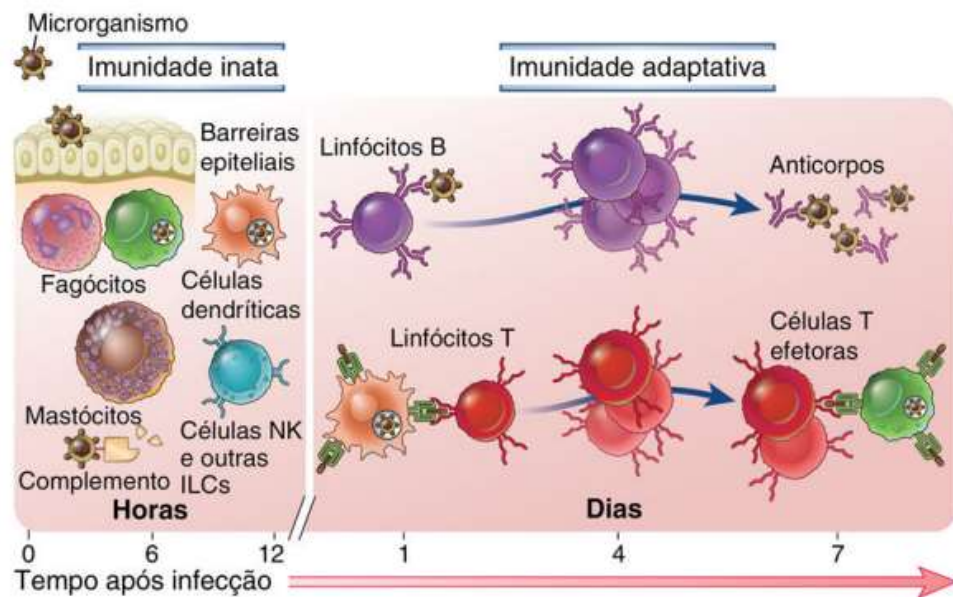


Figura 3: Resposta imune inata e adaptativa (Abbas, 2019)

3.4 IMUNOMODULAÇÃO NA INFECÇÃO POR *Leishmania*

Os macrófagos são as principais células envolvidas na resposta imune frente à infecção por *Leishmania*, eles fazem parte do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), responsável pela modulação de duas possíveis respostas, uma direcionada para a cura do indivíduo, e outra, pelo desenvolvimento da doença. Além de abrigarem os parasitos, os macrófagos atuam no controle e na modulação da resposta imune. Existem duas vias de ativação de macrófagos: a via de ativação clássica (perfil M1), e a via de ativação alternativa (perfil M2). A via M1 é ativada a partir de estímulos pró-inflamatórios como interferon gama (IFN- γ) e lipopolissacarídeos parasitários (LPS), isso faz com que ele produza níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias como a interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), levando ao aumento da capacidade microbicida, sendo essencial para a eliminação do parasito. Em contraponto, a via M2 é ativada a partir de citocinas anti-inflamatórias como a interleucina 4 e 13 (IL-4 e IL-13), promovendo, então, a produção de prolina, poliaminas e ureias, que fazem parte do suporte nutricional da *Leishmania*, o que favorece a sua manutenção e replicação (Santos-Pereira *et al.*, 2019).

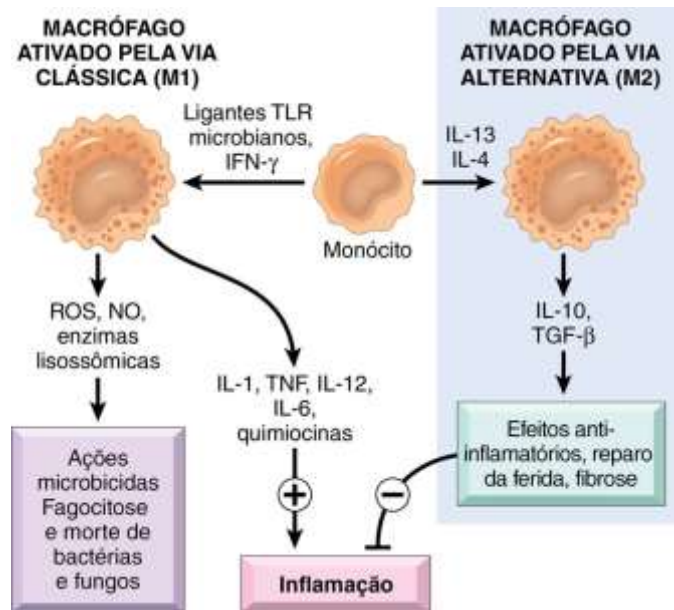


Figura 4: Vias de ativação de macrófagos (Kumar, 2021)

Os macrófagos parasitados e outras células apresentadoras de antígeno (APC) apresentam antígenos de *Leishmania* aos linfócitos T do tipo CD4+. Estes linfócitos são estimulados a produzir interleucinas (IL) e dependendo do perfil estimulado, ocorre o desenvolvimento de duas subpopulações de linfócito Th (Thelper). A Th do tipo 1 (Th1) secreta grande quantidade de TNF- α associado a produção de citocinas pró-inflamatórias, enquanto Th do tipo 2 (Th2) produz grande quantidade de IL-4 associada a citocinas promotoras da produção de anticorpos por linfócitos B. A resposta Th1 está associada a capacidade do hospedeiro em controlar a infecção e a resposta Th2, mais correlacionada com o processo progressivo da doença. Uma outra resposta que vem demonstrando grande relevância é a Th17, apresentando papel importante na regulação da resposta imune, atuando no recrutamento de neutrófilos e modulando citocinas pró-inflamatórias para o local da lesão, no entanto, ela pode se apresentar com caráter dual, podendo auxiliar tanto na resposta Th1 quanto na Th2 (Anderson *et al.*, 2009; Boaventura *et al.*, 2010; Almeida, 2013; De Oliveira *et al.*, 2021).

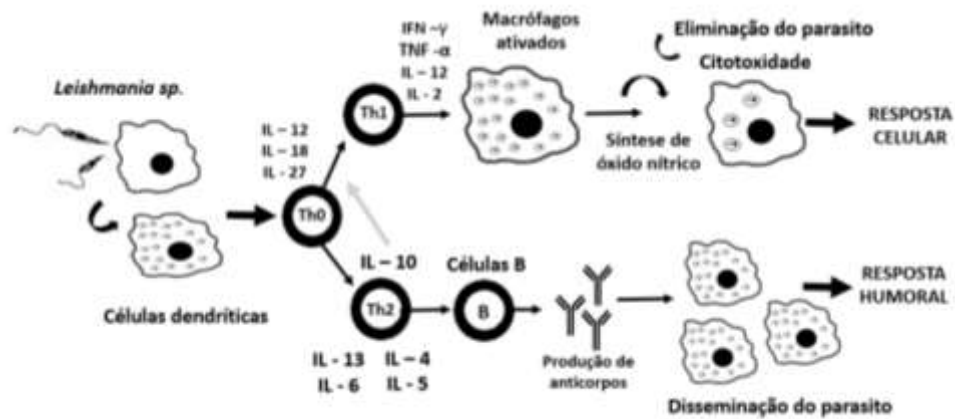


Figura 5: Resposta imune frente à *Leishmania* (Goes Filho, 2020)

Além disso, a resistência ao parasito pode ter outros fatores associados como por exemplo, a exaustão de linfócitos T, dentre outros, como foi descrito por Costa-Madeira *et al.* (2022) ao serem expostos exacerbadamente à antígenos e inflamação crônica, diversas funções das células T, principalmente as de memória, são alteradas. A exaustão dessas células impede uma resposta imune efetora por longos períodos e por isso, ocasiona a resistência (Costa-Madeira *et al.*, 2022).

3.5 TRATAMENTO

Os antimoniais pentavalentes são o pilar da farmacoterapia na leishmaniose desde a década de 1940, o antimoniato de meglumina segue sendo a primeira linha de tratamento para doença desde então, sendo eficaz para todas as manifestações clínicas da doença. Seu efeito imunomodulador está relacionado ao aumento da fagocitose, a indução da produção de TNF-α e consequente produção de NO por células do SMF (Paiva, 2023).

Nos casos em que os antimoniais não são indicados, as opções são a anfotericina B, a pentamidina, ou a miltefosina, o primeiro e até então único medicamento de administração oral desenvolvido, que começou a ser comercializado no Brasil há pouco tempo (De Mello *et al.*, 2014; Bastos *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2021). Apesar da miltefosina ser uma opção de administração mais confortável e não necessitar de hospitalizações para sua utilização, ela não tem diferenças estatisticamente significativas com relação a eficácia se comparada ao antimoniato, entretanto, possui efeitos adversos

gastrointestinais mais pronunciados causando mais desconforto que os outros medicamentos. Além disso, é um medicamento teratogênico, tornando-o contraindicado para gestantes devido ao risco de má formação fetal, e necessitando de controle especial para sua aquisição. Segundo Bastos *et al.* (2016) alguns pesquisadores sugerem propriedades imunomoduladores que auxiliam no seu mecanismo de ação, supostamente inibindo a resposta Th2 e estimulando a resposta Th1 (Bastos *et al.*, 2016; Sarmiento *et al.*, 2021; Santiago *et al.*, 2021).

A anfotericina B é indicada para formas resistentes à terapia com o antimoniato, e sendo preferível para o tratamento com comprometimento mucoso em imunossuprimidos. Existem duas apresentações da anfotericina B, a desoxicolato e a lipossomal, a diferença entre elas se dá pela toxicidade, tempo de tratamento e preço. A anfotericina lipossomal é menos tóxica, e diminui em mais da metade o tempo de tratamento, no entanto, custa o triplo do preço da desoxicolato. Apesar de modular a resposta imune com a produção de TNF- α e o aumento do estresse oxidativo, produzindo ROS, ela pode reduzir a capacidade fagocitária de neutrófilos (Pinto, 2006; Bastos *et al.*, 2016; Gomes, 2018).

A pentamidina é a alternativa para os casos em que os antimoniais e a anfotericina B não é indicado, é também o tratamento de primeira escolha para crianças. Seu mecanismo de ação e de modulação da resposta imune ainda não está bem estabelecido (Bastos *et al.*, 2016; Santiago *et al.*, 2021).

A imunoterapia combinada com o tratamento padrão vem sendo investigada devido ao alto índice de falha terapêutica, curso longo da doença e desenvolvimento de espécies resistentes, por isso, imunomoduladores se destacam visto que a leishmaniose se mostra uma enfermidade essencialmente imuno-mediada. As vacinas são medicamentos biológicos que fornecem uma imunidade adaptativa para determinadas doenças, por isso elas são uma opção terapêutica, no entanto, ainda não existem vacinas humanas disponíveis para a doença, havendo apenas vacinas em fase de teste. A VaxLeish[®] desenvolvida pela CTVacinas está em fase de testes *in vitro*, seus resultados preliminares demonstram segurança e eficácia na modulação da resposta imune (Brito, 2012; Santiago *et al.*, 2021).

As opções de prevenção e controle para leishmaniose são limitadas, por isso, a principal forma de profilaxia, é evitar a picada dos flebotomíneos. Isso pode ser possível através de proteção individual, com a utilização de repelentes e de mosquiteiros de malha fina, mas nem sempre estas medidas são efetivas (Siqueira-Batista, 2020).

3.6 CHALCONAS

As chalconas pertencem ao grupo dos flavonóides e estão presentes nas plantas das famílias *Leguminosae*, *Compositae* e *Moraceae*, são constituintes vitais de algumas plantas comestíveis e medicinais, está presente em frutas, vegetais, grãos, raízes, frutas e flores. Possui como estrutura base dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia insaturada de três carbonos e um grupo carbonila, podendo existir em duas formas isoméricas *trans* (E,1) e *cis* (Z, 2). Seu número de hidrogênios substituíveis torna a molécula uma importante precursora de derivados com diferentes atividades biológicas, que tem despertado interesse científico devido ao grande número de atividades farmacológicas identificadas, como a anticancerígena, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiparasitária (Slimestad & Verheul, 2011; Huang & Xiao, 2020; Wang *et al.*, 2020; Jasim *et al.*, 2021).

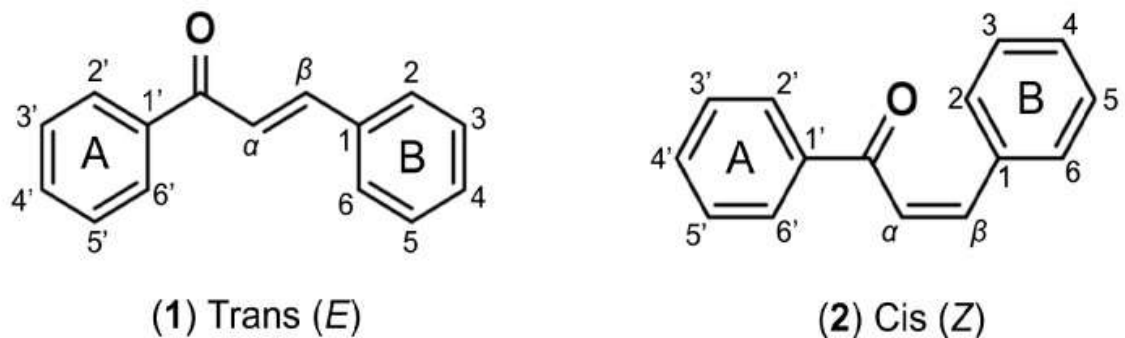


Figura 6: Representações estruturais e numéricas da chalcona (Gomes *et al.*, 2017)

Diferentes estudos vêm mostrando importante atividade antiparasitária de diversas chalconas. Ensaio *in vitro* demonstraram promissora ação para as formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, com potência de cerca de três vezes maior que o medicamento de referência utilizada para o tratamento, o Benzonidazol (Martinez, 2022). Outro estudo *in vitro* de duas

chalconas sintéticas, também destacou a inibição do crescimento do *Plasmodium falciparum* em concentrações inibitórias menores que as encontradas na literatura (Pereira, 2008).

3.7 FERAI

O estudo de Silva *et al.* (2023) mostrou que o FERAI tem ação *in silico* e *in vitro*. O FERAI foi capaz de causar importantes alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. braziliensis* tanto na concentração de 10 μ M (Figura 7C e 7F), quanto na concentração de 5 μ M (Figura 7B e 7E), quando comparado ao grupo não tratado (Figura 7A e 7D), afetando estruturas como flagelo, membrana, núcleo e mitocôndria, além de ser possível observar vacúolos lipídicos no seu citoplasma. Somado a isso, O FERAI também foi capaz inibir a infecção de formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* em baixas concentrações (9,75 \pm 1,7 μ M e 10,13 \pm 1,7 μ M, respectivamente), sendo cerca de seis vezes mais seletivo para células de parasito do que para as células de macrófagos J774 utilizadas nesse estudo (Santos, 2023).

Este estudo sugeriu, portanto, que o FERAI pode ser uma alternativa terapêutica promissora no tratamento da leishmaniose. Entretanto, ainda não há relato na literatura sobre o papel do FERAI na modulação do sistema imunológico na infecção por *L. braziliensis*.

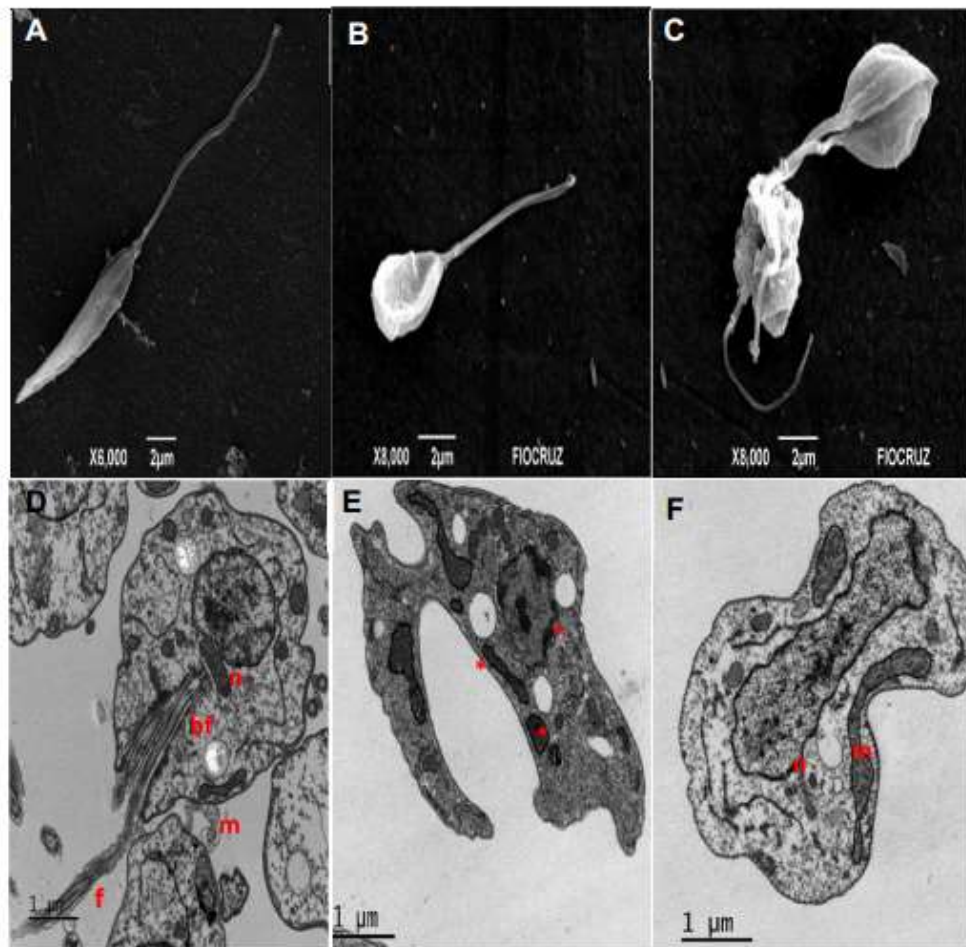


Figura 7: Alterações ultraestruturais do FERAI em promastigotas de *L. braziliensis* (Fonte: Santos, 2023)

Microscopia eletrônica de varredura (7A, 7B e 7C) e Microscopia eletrônica de transmissão (7D, 7E e 7F). Promastigotas de *L. braziliensis* não tratados (7A e 7D), tratados com 5 μM (7B e 7E) e com 10 μM de FERAI (7C e 7F). Flagelo (f). Bolsa flagelar (bf). Mitocôndria (m). Núcleo (n). Vacúolos lipídios (*).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 O FERAI

A chalcona em estudo foi sintetizada e enviada para o nosso grupo de pesquisa pelo Prof. Dr. Hemerson Iury Ferreira Magalhães da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), para fins de investigação da atividade biológica da molécula, visto que estudos preliminares *in silico* demonstraram uma possível predição desta molécula para atividade antileishmania. Em resumo, a síntese foi realizada inicialmente com a bromação da vanilina, seguida da etilação da bromo-vanilina e então, condensação aldólica entre a bromo etil vanilina e a 3,4-(metilenodioxil)acetofenona (Silva *et al.*, 2023).

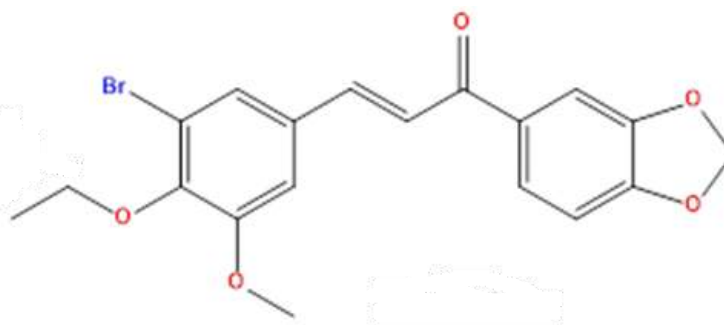


Figura 8: Estrutura Química do FERAI (E)-1-benzo[d][1,3]dioxol-5-il)-3-(3-bromo-4-etoxi-5-metoxifenil)prop-2-en-1-ona

4.2 CULTURA DE CÉLULAS E PARASITOS

Macrófagos imortalizados de linhagem J774 foram cultivados em meio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium* - DMEM; Life Technologies, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), com 10% de soro bovino fetal (SBF, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 0,01% gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), e mantidos na estufa sob as condições de 37°C e 5% de CO₂.

As formas promastigotas de *L. braziliensis* (cepa MHOM/BR88/BA-3456) foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) com 10% de SBF (SBF, Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 0,01% gentamicina (Novafarma, Anápolis, GO, Brasil), e mantidas na incubadora a 26°C. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer por cinco dias, ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* foram realizadas.

4.3 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Macrófagos J774 (1×10^5 células/poço) foram plaqueados, respeitando o tempo mínimo de 2h para adesão celular, e então, foram tratados com diferentes concentrações do composto em estudo (50-3,25 μ m), diluídas $\frac{1}{2}$ e em triplicada. A dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a anfotericina b (GIBCO, Brasil) foram utilizadas como controle positivo, e a violeta de genciana (Synth, São Paulo, SP, Brasil), droga toxica de referência, foi utilizada como controle do ensaio. As drogas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) em quantidade suficiente (previamente calculada) para obtenção de uma solução estoque de 10 μ M. Após 72h mantidas a 37°C e 5% de CO₂, foi adicionado aos poços a solução colorimétrica AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, a placa foi lida em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 570nm a 600nm, gerando o valor do Índice de Concentração Citotóxica para 50% dos macrófagos (CC₅₀).

4.4 DOSAGEM DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO

Macrófagos J774 (1×10^5 células/poço) foram plaqueados, respeitando o tempo mínimo de 2h para adesão celular, em seguida foram ativados em três diferentes grupos: (1) o grupo de infectados por formas promastigotas de *L. braziliensis* na razão de 10:1 parasitos/macrófago (1×10^6 parasitos/poço); (2) o grupo de infectados por formas promastigotas de *L. braziliensis* na razão de 10:1 parasitos/macrófago (1×10^6 parasitos/poço) e estimulados por lipopolissacarídeos (LPS, 500ng/mL, Escherichia coli sorotipo 0111:B4, Sigma); e (3) o grupo de estimulados por LPS (500ng/mL, Escherichia coli sorotipo 0111:B4, Sigma). Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações do FERAI (10-0,625 μ M), diluídas $\frac{1}{2}$ e em triplicada. A dexametasona (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e a anfotericina b (GIBCO, Brasil) foram utilizadas como controle positivo do ensaio. As drogas foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) em quantidade suficiente (previamente calculada) para obtenção de uma solução estoque de 10 μ M. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 4h para coleta de sobrenadante e posterior dosagem de TNF- α , e 24h e 48h para coleta de sobrenadante e posterior dosagem das citocinas IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12 e TGF- β pelo método de ELISA seguindo as instruções do fabricante do kit

Elabscience (Elabscience, Houston, Texas, EUA), e do NO pela reação de Griess (Green *et al.*, 1982).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste one-way ANOVA seguido pelo pós-teste de comparações múltiplas de Bonferroni serão utilizados para determinar a significância estatística das comparações entre os grupos nos estudos *in vitro*. Os resultados serão considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$. Todas as análises serão realizadas utilizando o programa GraphPad Prism versão 9 (Graph Pad Software, San Diego, CA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 O FERAI POSSUI BAIXA CITOTOXICIDADE

O FERAI apresentou valor de CC_{50} de $66 \pm 0,12 \mu\text{M}$, sendo cerca de dezoito vezes menos citotóxico que a anfotericina B (CC_{50} de $3,6 \pm 0,50 \mu\text{M}$), medicamento de referência para o tratamento da leishmaniose e cerca de duas vezes menos citotóxico que a dexametasona (CC_{50} de $33,83 \pm 0,13 \mu\text{M}$), medicamento de referência para doenças imunomediadas. A violeta de genciana, uma droga com atividade citotóxica já reconhecida, apresentou valor de CC_{50} de $0,6 \pm 0,01 \mu\text{M}$ (Tabela 1).

Tabela 1: Citotoxicidade do FERAI frente à macrófagos murinos

Moléculas	$CC_{50} \pm DP$ MØ J774-G8 (μM)
FERAI	$66 \pm 0,12$
Anfotericina B	$3,6 \pm 0,50$
Dexametasona	$33,83 \pm 0,13$
Violeta de Genciana	$0,6 \pm 0,01$

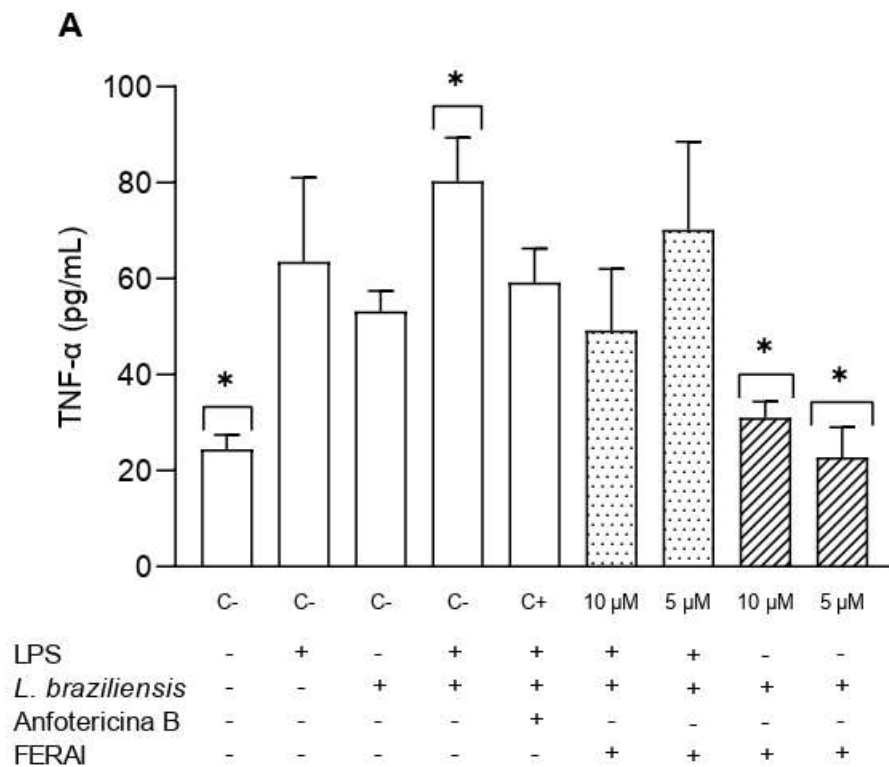
CC_{50} =Concentração Citotóxica de 50%. Valores calculados a partir de dois experimentos independentes.

A citotoxicidade é um parâmetro inicial importante para avaliar a capacidade de substâncias químicas serem danosas ou não para as células e os tecidos, sendo necessária para encontrar um equilíbrio entre possíveis efeitos farmacológicos e os efeitos toxicológicos, permitindo avaliar o potencial terapêutico e a sua segurança (Melo *et al.*, 2000; O'Brien *et al.*, 2000; Eisenbrand *et al.*, 2002).

Os resultados encontrados corroboram com outros resultados de diferentes autores que demonstram baixa citotoxicidade de chalconas em macrófagos murinos (De Mello *et al.*, 2014) e em vários outros tipos celulares como as cancerígenas (Letafat *et al.*, 2013; Otero *et al.*, 2014; Burmaoglu *et al.*, 2022).

5.2 PRODUÇÃO DE TNF- α e NO APÓS O TRATAMENTO OU NÃO DE MACRÓFAGOS COM FERAI

Após 4h de tratamento, o FERAI inibiu a produção de TNF- α , tanto no grupo apenas infectado por *L. braziliensis* quanto no grupo infectado e estimulado com LPS, quando comparados ao controle negativo (estímulo com LPS + infecção, mas não tratado) (Figura 9A). Após 24h de tratamento, a produção de NO foi aumentada em todos os grupos tratados, especialmente no grupo infectado e estimulado na concentração de 10 μ M, quando comparado ao não tratado (Figura 9B).



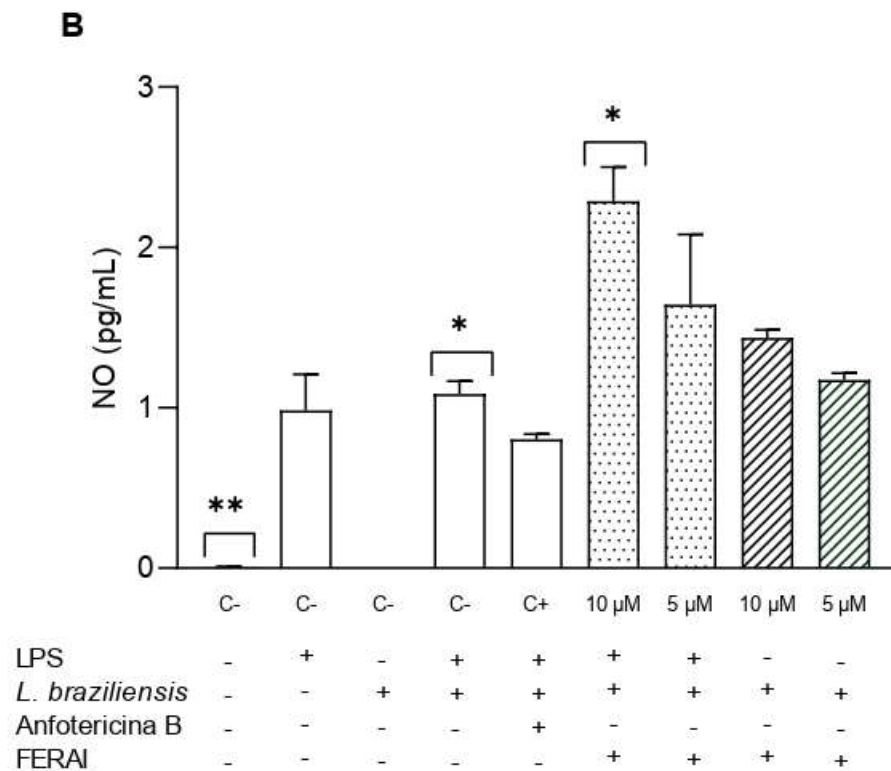


Figura 9: Produção de TNF- α e NO em macrófagos murinos tratados com FERA1
 Dosagem de: (A) TNF- α após 4h de tratamento; (B) NO após 24h de tratamento. Os asteriscos indicam a comparação das células infectadas por *L. braziliensis*, estimuladas com LPS e tratadas com FERA1, com as células apenas infectadas e estimuladas, mas não tratadas (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória, ela desempenha papel crucial na defesa contra patógenos, e é rapidamente produzida na fase aguda de infecções. Na *Leishmania spp.* ela induz a produção de IFN- γ por linfócitos, e ambos produzem o NO e ROS responsáveis pela atividade microbicida que culmina com o não desenvolvimento da doença (De Oliveira *et al.*, 2021).

O estudo de Souza *et al.* (2010) avaliou a produção de TNF- α em macrófagos humanos, de pacientes infectados por *L. braziliensis*, e se essas células eram resistentes ou susceptíveis à produção de NO. Nele, foi observado que os macrófagos resistentes ao NO não produziram TNF- α , e esses resultados estão relacionados a refratariedade ao tratamento. Além disso, a resistência ao NO está associada diretamente ao tamanho da lesão cutânea

nesses pacientes, indicando a importância desses produtos para condução do tratamento (Souza *et al.*, 2010).

Rodrigues (2020) também observou a produção *in vitro* de TNF- α e NO em macrófagos infectados por *L. braziliensis* que foram tratados com extrato de *Amburana cearensis*, planta da família *Leguminosae* (Rodrigues, 2020). Outro estudo com chalconas sintéticas também observaram a produção de NO em macrófagos infectados por *L. braziliensis* (De Mello *et al.*, 2014). A anfotericina B, o tratamento de segunda escolha para leishmaniose e controle positivo do presente estudo, também modula a resposta imune através da produção da TNF- α e de NO (Pinto, 2006; Bastos *et al.*, 2016; Gomes, 2018).

5.3 FERAI INIBE A PRODUÇÃO DE OUTRAS CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS

A inibição das citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-12 foi observada após 48 horas de tratamento com o FERAI, tanto na concentração de 10 μ M quanto na de 5 μ M. De maneira similar, esta inibição também foi observada nos grupos tratados com a anfotericina B e a dexametasona, quando comparados ao grupo não tratado (Figura 10). Estes resultados confirmam outro estudo realizado pelo nosso grupo, em que o FERAI inibiu a produção desse conjunto de citocinas em macrófagos ativados por LPS (Uzêda, 2024).

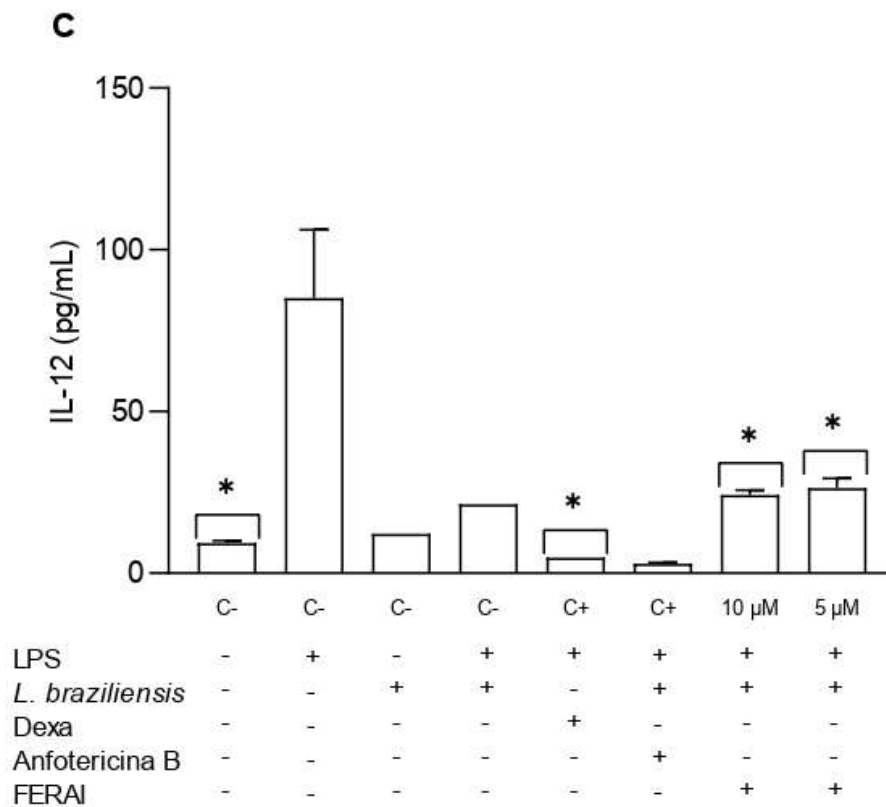


Figura 10: Produção de citocinas pró-inflamatórias em macrófagos murinos tratados com FERAI

Dosagem de: (A) IL-1 β ; (B) IL-6; (C) IL-12 após 48h de tratamento. Os asteriscos indicam a comparação das células estimuladas e tratadas com as células estimuladas com LPS (* $p < 0,05$).

As citocinas pró-inflamatórias associadas a resposta Th1 desempenham papel fundamental no controle da infecção por *Leishmania*, no entanto, sua produção exacerbada tem sido associada ao aparecimento de lesões ulceradas características da leishmaniose, demonstrando que ainda que esta seja uma resposta protetora, quando exagerada, causa dano tecidual (De Oliveira *et al.*, 2021). A IL-1 β atua propagando a inflamação, servindo de gatilho para expressão de outras citocinas pró-inflamatórias (Amorim, 2021). A IL-6 ainda que esteja ligada a uma atividade protetora, pode possuir um perfil anti ou pró-inflamatórios, possuindo diversos mecanismos que depende da interação com outros produtos da resposta imune para determinar sua resposta na infecção por *Leishmania* (Silva, 2016). Ademais, a IL-12 é uma importante mediadora na

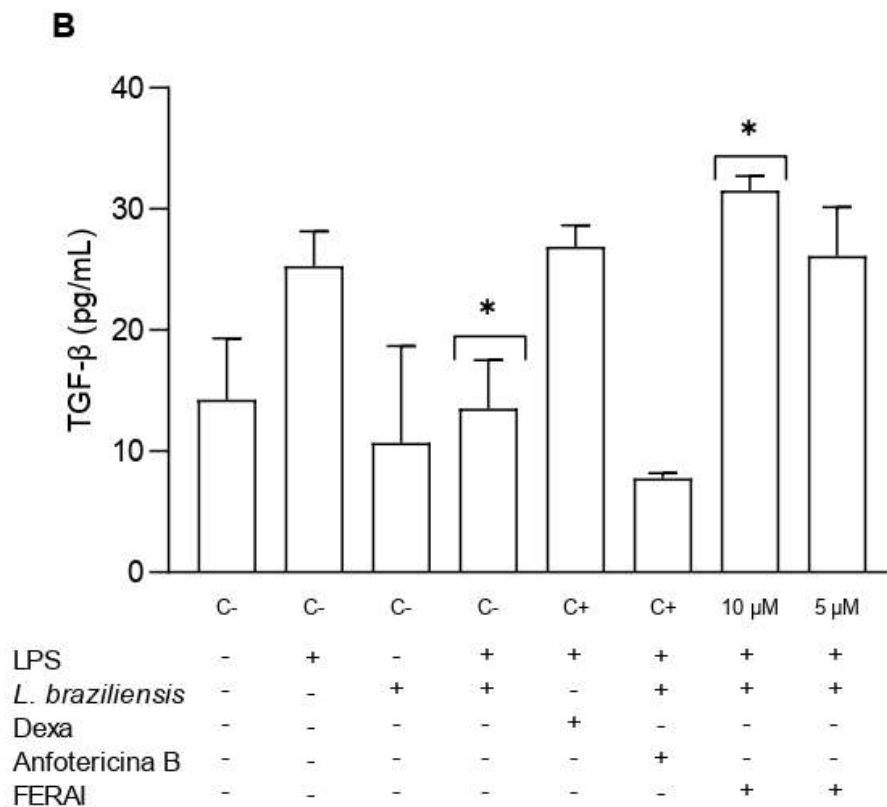


Figura 11: Produção de citocinas anti-inflamatórias em macrófagos murinos tratados com FERA I

Dosagem de: (A) IL-10; (B) TGF- β após 48h de tratamento. Os asteriscos indicam a comparação das células infectadas por *L. braziliensis*, estimuladas com LPS e tratadas com FERA I, com as células apenas infectadas e estimuladas, mas não tratadas (* $p < 0,05$).

Citocinas anti-inflamatórias estão associadas a resposta Th2, que favorece a replicação do parasito e o desenvolvimento da doença, no entanto, elas têm papel fundamental no reparo ao dano tecidual, sugerindo que um contrabalanço entra a resposta Th1 e Th2 é a ideal no curso da infecção por *Leishmania* (Almeida, 2013; De Oliveira *et al.*, 2021). IL-10 e TGF- β são citocinas reguladoras e possuem efeitos antagonistas em citocinas pró-inflamatórias. Por exemplo, a IL-10 é secretada quando há uma superprodução de citocinas pró-inflamatórias como a IL-12, enquanto isso, o TGF- β trabalha de forma conjunta com a IL-6 para indução da resposta Th17, ambas citocinas são importantes moduladores da resposta imune na leishmaniose (Almeida, 2013; Oliveira, 2013; Gomes, 2018).

Rodrigues (2020) também observou a produção *in vitro* de IL-10 em macrófagos infectados por *L. braziliensis* que foram tratados com extrato de *Amburana cearensis*, planta da família *Leguminosae* (Rodrigues, 2020). Outro estudo também destacou que a chalcona sulfonamida induziu a produção de IL-10 e TGF- β *in vitro* em células de exsudato peritoneal submetidas a infecção parasitária (Bhoj *et al.*, 2019).

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados desse estudo com o FERAI corroboram com outros resultados do nosso grupo de pesquisa. Santos em 2023, mostrou que o FERAI possui ação *in vitro* antileishmania direta, segura e eficaz, afetando vias bioquímicas e organelas importantes no parasito como a membrana, a mitocôndria e o núcleo. Enquanto Uzêda em 2024, demonstrou importante atividade imunossupressora e anti-inflamatória, inibindo a proliferação de linfócitos e a secreção de citocinas por linfócitos e macrófagos murinos *in vitro* e modulando as alterações teciduais em resposta ao edema de pata em modelo experimental *in vivo*. O presente estudo reforça estes resultados, sugerindo que o FERAI, além de possuir atividade direta no parasito de *L. braziliensis*, pode exercer uma importante atividade imunomoduladora no desenvolvimento das lesões. Novos estudos serão realizados a fim de avaliar o papel desta molécula em modelo experimental de leishmaniose cutânea.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K. **Imunologia celular e molecular** / Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai ; ilustração David L. Baker ; [tradução Anderson de Sá Nunes, Soraya Imon de Oliveira]. - 9. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2019.
- ALMEIDA, A. F. **Avaliação da produção de citocinas Th17, Th1 e Th2 por linfócitos T em pacientes com leishmaniose tegumentar americana**. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Saúde Pública) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2013.
- AMORIM, E. A. S. **Avaliação das interleucinas (IL) -1 α , 1 β , 1Ra, 18 e 37 em células de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2021. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2021.
- ANDERSON, C. F., STUMHOFER, J. S., HUNTER, C. A., & SACKS, D. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing Leishmania major infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 7, p. 4619-4627, 2009.
- 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.
- BHOJ, P., TOGRE, N., BAHEKAR, S., GOSWAMI, K., CHANDAK, H., PATIL, M. Immunomodulatory activity of sulfonamide Chalcone compounds in mice infected with filarial parasite, Brugia malayi. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, v. 34, p. 225-229, 2019.
- BOAVENTURA, V. S., SANTOS, C. S., CARDOSO, C. R., DE ANDRADE, J., DOS SANTOS, W. L., CLARÊNCIO, J., BARRAL, A. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European journal of immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830-2836, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 189 p. : il.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014. 120 p.: il.
- BRITO, M.G.O. **Imunoterapia na leishmaniose cutânea** (dissertação). / Maria das Graças de Oliveira Brito. – Salvador, 2012.
- BURMAOGLU, S. et al. Design, synthesis and antiproliferative activity evaluation of fluorine-containing chalcone derivatives. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 40, n. 8, p. 3525–3550, 2022.
- CARVALHO, J. D. P., ASSIS, T. M. D., SIMÕES, T. C., & COTA, G. Estimating direct costs of the treatment for mucosal leishmaniasis in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. e04542020, 2021.
- CASTAÑO, L. F.; CUARTAS, V.; BERNAL, A.; INSUASTY, A.; GUZMAN, J.; VIDAL, O.; RUBIO, V.; PUERTO, G.; LUKAC, P.; VIMBERG, V.; BALÍKOVÁ-NOVTONÁ, G.; VANUCCI, L.; JANATA, J.; QUIROGA, J.; ABONIA, R.; NOGUERAS, M.; COBO, J.; INSUASTY, B. New chalcone-sulfonamide hybrids exhibiting anticancer and antituberculosis activity. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 176, p. 50-60, 2019.

COSTA, L. M., DE MORAES ALVES, M. M., BRITO, L. M., DE ARAUJO ABI-CHACRA, E., BARBOSA-FILHO, J. M., GUTIERREZ, S. J. C., ... & DE AMORIM CARVALHO, F. A. In vitro antileishmanial and immunomodulatory activities of the synthetic analogue riparin E. **Chemico-Biological Interactions**, v. 336, p. 109389, 2021.

COSTA-MADEIRA J.C., TRINDADE G.B., ALMEIDA P.H.P., SILVA J.S., CARREGARO V. T Lymphocyte Exhaustion During Human and Experimental Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**. v. 2; n. 13, p. 835711, 2022.

DE MELLO, T. F. P.; BITENCOURT, H. R.; PEDROSO, R. B.; ARISTIDES, S. M. A.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V. Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 136, n. 1, p. 27–34, 2014.

DE OLIVEIRA, D. K. F., DA SILVA SOARES, M. E. H., DE BRITO, K. M. L., DE LIRA, E. S., & ROCHA, F. J. S. Aspectos imunológicos das leishmanioses dermatrópicas e viscerotrópicas. **Revista Unimontes Científica**, v. 23, n. 2, p. 1-14, 2021.

EISENBRAND, G., POOL-ZOBEL, B., BAKER, V., BALLS, M., BLAAUBOER, B. J., BOOBIS, A., CARERE, A., KEVEKORDS, S., LHUGUENOT, J. C., PIETERS, R., KLEINER, J. **Methods of in vitro toxicology. Food and chemical toxicology**, v. 40, n. 2-3, p. 193-236, 2002.

GOES FILHO, P. R. S. **Avaliação da densidade parasitária na pele íntegra e níveis séricos de vitamina D em cães com infecção natural por *Leishmania infantum* submetidos ao tratamento com tiazacetilpiridina – 04**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-graduação Biociência Animal, Recife, 2020.

GOMES, F. R.. **Estudo piloto sobre imunomodulação na leishmaniose visceral murina: bloqueio da sinalização de IL-10 e uso de IL-12**. 80 f. il. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2018.

GOMES, M. N.; MURATOV, E. N.; PEREIRA, M.; PEIXOTO, J. C.; ROSSETO, L. P.; CRAVO, P. V. L.; ANDRADE, C. H.; NEVES, B. J. Chalcone derivatives: Promising starting points for drug design. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 8, p. 1210, 2017.

GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P. L., WISHNOK, J. S., & TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.

HIRANO, I. et al. Efficacy of Dupilumab in a Phase 2 Randomized Trial of Adults With Active Eosinophilic Esophagitis. **Gastroenterology**, [s. l.], v. 158, n. 1, p. 111-122.e10, 2020.

HUANG, G.; XIAO, J. Chalcone hybrids as potential anticancer agents: Current development, mechanism of action, and structure-activity relationship. **Medicinal Research Review**, v. 40, n. 5, p.2049-2084, 2020.

JASIM, H. A.; NAHAR, L.; JASIM, M. A.; MOORE, S. A.; RITCHIE, K. J.; SARKER, S. D. Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. **Biomolecules**, [s. l.], v. 11, n. 8, p. 1203, 2021.

KANE, M. M.; MOSSER, D. M. *Leishmania* parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Current Opinion in Hematology**, v. 7, n. 1, p. 26–31, 2000.

KIM, K. et al. Anti-inflammatory effects of trans-1,3-diphenyl-2,3-epoxypropane-1-one mediated by suppression of inflammatory mediators in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages. **Food and chemical toxicology : an**

international journal published for the British Industrial Biological Research Association, [s. l.], v. 53, p. 371–5, 2013.

KUMAR, V. **Robbins patologia básica**/Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Jon C. Aster; [tradução Tatiana Ferreira Robaina] ... [et al.] – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: GEN | Grupo Editorial Nacional. Publicado pelo selo Editora Guanabara Koogan Ltda., 2021.

LETAFAT, B. et al. Synthesis and In vitro Cytotoxic Activity of Novel Chalcone-like Agents. **Iran J Basic Med Sci.** [S. l.: s. n.], 2013.

MACHADO P.R.L., LAGO A., CARDOSO T.M., MAGALHAES A., CARVALHO L.P., LAGO T., CARVALHO A.M., COSTA R., CARVALHO E.M. Leishmaniose Disseminada, uma Forma Grave de Infecção por *Leishmania braziliensis*. **Doenças Infeciosas Emergentes.** v. 30, n. 3, p. 510, 2024.

MAGALHÃES, T. B. D. S., SILVA, D. K. C., TEIXEIRA, J. D. S., DE LIMA, J. D. T., BARBOSA-FILHO, J. M., MOREIRA, D. R. M., GUIMARÃES, E.T., SOARES, M. B. P. A betulinic acid derivative, BA5, induces G0/G1 cell arrest, apoptosis like-death, and morphological alterations in *Leishmania* sp. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 846123, 2022.

MARTINEZ, G. **Síntese e potencial anti-chagas de Chalconas Geraniladas**. Tese de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho, 2022.

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.

MUKHERJEE, S. et al. Oral Therapy Using a Combination of Nanotized Antimalarials and Immunomodulatory Molecules Reduces Inflammation and Prevents Parasite Induced Pathology in the Brain and Spleen of *P. berghei* ANKA Infected C57BL/6 Mice. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 12, n. January, p. 1–17, 2022.

MURPHY, K. **Imunobiologia de Janeway** [recurso eletrônico]/ Kenneth Murphy; tradução: Denise C. Machado, Gaby Renard, Lucien Peroni Gualdi; revisão técnica: Denise C. Machado. - 8. ed. - Dados eletrônicos. - Porto Alegre : Artmed, 2014.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M.; VITOR, RICARDO W. A. **Parasitologia Humana**. – 11.ed. – Editora Atheneu, 2005.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, [s. l.], v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OLIVEIRA, W. N. F. **Regulação da resposta inflamatória na leishmaniose tegumentar: papel de il-10, tgf-β e il-27** (Dissertação). Programa de Pós-Graduação em Imunologia, Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Doenças tropicais negligenciadas: Leishmaniose**. O Observatório Global de Saúde, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/data/gho/data/themes/topics/gho-ntd-leishmaniasis>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Diretrizes para o tratamento das leishmanioses na Região das Américas. Segunda edição. Washington, DC: OPAS; 2022. Disponível em <https://doi.org/10.37774/9789275725030>.

OTERO, E. et al. Synthesis, leishmanicidal and Cytotoxic activity of triclosan-chalcone, triclosan-chromone and triclosan-coumarin hybrids. **Molecules**, [s. l.], v. 19, n. 9, p. 13251– 13266, 2014.

PAIVA, Y.T.C.N. **Imunomodulação da resposta inflamatória induzida *in vitro* com cepa de *Leishmania braziliensis* resistente ao tratamento** (dissertação)/ Yuri Tayro Carneiro Nóbrega Paiva. – 2023.

PEREIRA, G. A. N. **Atividade antiplasmodial e modelagem molecular de novas chalconas e derivados**. 2008.

PINTO, O.M.F.C. **Influência, *in vitro*, da vancomicina, da anfotericina-b desoxicolato e de ambas sobre a função fagocitária, produção de radicais de oxigênio e fator de necrose tumoral- α por fagócitos do sangue periférico de indivíduos normais** (dissertação). Brasília: Universidade de Brasília. 2006.

REY, L. **Bases da Parasitologia médica** / Luís Rey. – 3.ed. – Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. il.

ROCHA V.P.C., QUINTINO DA ROCHA C., FERREIRA QUEIROZ E., MARCOURT L., VILEGAS W., GRIMALDI G.B., FURRER P., ALLÉMANN É., WOLFENDER J-L., SOARES M.B.P. Antileishmanial Activity of Dimeric Flavonoids Isolated from *Arrabidaea brachypoda*. **Molecules**. v. 24, n. 1, p. 1, 2018.

RODRIGUES, N. L. C. **Bioprospecção e seleção de ativos de *Amburana cearensis* com efeito leishmanicida (*Leishmania braziliensis*) por imunomodulação** (Tese). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, 2020.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Leishmaniasis treatment, current therapy limitations and new alternative requirements: A narrative review. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021. DOI: 10.33448/rsd-v10i7.16543.

SANTOS, S. F. **Avaliação da atividade e do mecanismo de ação da chalcona E1- 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.

SANTOS-PEREIRA, S.; CARDOSO, F. O.; CALABRESE, K. S.; DO VALLE, T. Z. *Leishmania amazonensis* resistance in murine macrophages: Analysis of possible mechanisms. **Plos one**, v. 14, n. 12, p. e0226837, 2019.

SARMENTO, V. A. S., COSTA, E. W. DA S., DA SILVA, B. A., MENDONÇA, A. C. ÁVILA, ALVES, B. B., GOMES, V. F. DE O., BASTOS, I. V. M., & DE OLIVEIRA, G. A. Alterações Hematológicas em cães soropositivos ao DPP e ELISA para *Leishmania infantum* submetidos ao tratamento com Miltefosina 2%. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 4, n. 4, p. 5159-5172, 2021.

SILVA, G. R., LEITE, F. F., ACEVEDO, C. A. H., SANTOS, F. S., GRIMALDI, G. B., SOARES, M. B. P., ... & GUERRA, F. Q. S. Pharmacological properties of new chalcones for treatment of leishmaniasis: *in silico* and *in vitro* studies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. 2023.

SILVA, I. C. **Papel da interleucina 6 (IL-6) na resposta inflamatória neutrofílica durante a infecção por *Leishmania infantum*** (Dissertação). Ribeirão Preto, 2016. Programa de pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada.

SINGH, G.; ARORA, A.; KALRA, P.; MAURYA, I. K.; RUIZC, C. E.; ESTEBANC, M. A.; SINHA, S.; GOYAL, K.; SEHGAL, R. A strategic approach to the synthesis of ferrocene appended chalcone linked triazole allied organosilatrane: Antibacterial, antifungal, antiparasitic and antioxidant studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 27, n. 1, p. 188-195, 2019.

SIQUEIRA-BATISTA, R. **Parasitologia - Fundamentos e Prática Clínica**: Grupo GEN, 2020. *E-book*. ISBN 9788527736473.

SLIMESTAD, R.; VERHEUL, M. Properties of chalconaringenin and rutin isolated from cherry tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [s. l.], v. 59, n. 7, p. 3180–3185, 2011.

SOUZA, A. S., GIUDICE, A., PEREIRA, J. M., GUIMARÃES, L. H., DE JESUS, A. R., DE MOURA, T. R., ... & ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- α production. **BMC infectious diseases**, v. 10, p. 1-11, 2010.

UZÊDA, L. F. A. **Avaliação do potencial imunomodulador da chalcona (E)-1-BENZO[D][1,3]DIOXOL-5-IL)-3-(3-BROMO-4-ETOXI-5-METOXIFENIL)PROP-2-EN-1-ONA em macrófagos e linfócitos murinos** (Dissertação). Salvador, 2024. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. Programa de Pós-Graduação Stricto sensu em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA.

WANG, D., LIANG, J., ZHANG, J., WANG, Y., & CHAI, X. Natural chalcones in Chinese materia medica: Licorice. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2020, n. 1, p. 3821248, 2020.

XIN, Y. J., CHOI, S., ROH, K. B., CHO, E., JI, H., WEON, J. B., JUNG, E. Anti-Inflammatory Activity and Mechanism of Isookanin, Isolated by Bioassay-Guided Fractionation from *Bidens pilosa* L. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 255, 2021.

ZHAO, Y.; JIAO, Y.; WANG, L. Hesperidin methyl chalcone alleviates spinal tuberculosis in New Zealand white rabbits by suppressing immune responses. **The journal of spinal cord medicine**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 532–539, 2020.