MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
CURSO DE BIOMEDICINA

THAÍS AMANDA DE LIMA NUNES

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO CURZERENO: EFEITOS SOBRE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

PARNAÍBA
2021

THAÍS AMANDA DE LIMA NUNES

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO CURZERENO: EFEITOS SOBRE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Delta do Parnaíba, Campus Ministro Reis Velloso, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof°: Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues

PARNAÍBA

2021

THAÍS AMANDA DE LIMA NUNES

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO CURZERENO: EFEITOS SOBRE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

Aprovada em___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Prof°. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues

Orientador

Dra. Juliana da Câmara Rocha

1ª Examinadora

Dra. Alyne Rodrigues de Araújo

2ª Examinadora

THAÍS AMANDA DE LIMA NUNES

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus ParnaíbaServiço de Processamento Técnico

N972a Nunes, Thaís Amanda de Lima
Atividade antileishmania do curzereno: efeitos sobre *Leishmania (Leishmania*) *amazonensis* e possíveis mecanismos de ação [recurso eletrônico] / Thaís Amanda de Lima Nunes. – 2021.
1 Arquivo em PDF

Monografia (Bacharelado em Biomedicina) - Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2021.
Orientação: Profº. Dr. Klinger Antonio da Franca Rodrigues.

1. Curzereno. 2. *L. amazonensis.* 3. Antileishmania. I. Titulo.

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO CURZERENO: EFEITOS SOBRE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* E POSSÍVEIS MECANISMOS DE AÇÃO

Thaís Amanda de Lima Nunes[a]; Malu Mateus Santos[b]; Mariana Silva de Oliveira[b]; Julyanne Maria Saraiva de Sousa[a]; Alyne Rodrigues de Araújo[c]; Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira[d]; Gustavo Portela Ferreira[d]; Virmondes Rodrigues Junior[b]; Marcos Vinicius da Silva[b]; Klinger Antonio da Franca Rodrigues[a*]

[a]*Laboratório de Doenças Infecciosas, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 64202-020, Parnaíba, PI, Brasil*

[b]*Laboratório de Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas e Naturais, Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 38025-180, Uberaba, MG, Brasil*

[c]*Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 64202-020, Parnaíba, PI, Brasil*

[d]*Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Microrganismos e Plantas, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 64202-020, Parnaíba, PI, Brasil*

* Autor correspondente

Klinger Antonio da Franca Rodrigues

Laboratório de Doenças Infecciosas, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 65202-020, Parnaíba, PI, Brazil

Tel: +55 83 98636-3310 Email: klinger@ufpi.edu.br

Resumo

As leishmanioses são um conjunto de doenças infecciosas que afetam milhões de pessoas por todo o mundo com alto índice de morbidade e mortalidade. O tratamento, realizado principalmente com antimoniais pentavalentes, possui elevado toxicidade e muitos casos de resistência. Em trabalhos anteriores demonstramos a atividade antileishmania efetiva e seletiva do óleo essencial de *Eugenia uniflora* L., constituído em 47,3 % pelo sesquiterpeno curzereno. Considerando a problemática do tratamento das leishmanioses e a ausência de estudos do curzeno, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania do constituinte e possíveis mecanismos de ação. O curzereno mostrou-se efetivo em inibir o crescimento de formas promastigotas (CI_{50} 3,09 µM) e amastigotas axênicas (CE_{50} 2,56 µM), com baixa citotoxicidade para macrófagos RAW 264.7 (CC_{50} 83,87 µM). Foi observado que o curzereno apresenta efeitos diretos sobre o parasito, induzindo morte celular por apoptose com secundária morte por necrose produzindo poros na membrana plasmática. O constituinte mostrou-se ainda mais efetivo sobre formas amastigotas intramacrofágicas, com CE_{50} de 0,46 µM. O índice de seletividade demonstrado pelo curzereno sobre estas formas foi de 182,32, sendo o sesquiterpeno 43,51 e 5,66 vezes mais seletivo que antimoniato de meglumina e anfotericina B, respectivamente. A atividade antiamastigota do curzereno foi associada ao aumento do volume lisossomal bem como ao aumento dos níveis de NO, demonstrando também atividade indireta pela ativação de macrófagos. Em conclusão, os resultados demonstram que o curzereno é um agente antileishmania efetivo e seletivo, candidato a ser investigado em modelos *in vivo* de atividade antileishmania.

Key-words: Curzereno; *L. amazonensis*; antileishmania

1. Introdução

As leishmanioses são um espectro de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos através da picada da fêmea do inseto vetor, principalmente os do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (Hendrickx et al., 2019). A Organização mundial da saúde categoriza como uma doença emergente ou não controlada, com cerca de 12 milhões de pessoas infectados e estima-se que são mais de 350 milhões de pessoas consideradas em risco (Boniface et al., 2019). É considerada uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) pelos grupos de pessoas que afetam (geralmente de baixa classe de renda) e pela falta de investimento que se tem no tratamento quimioterápico (Charlton et al., 2018; Braga, 2019).

As manifestações clínicas das leishmanioses variam de acordo com a espécie e com a resposta imune do hospedeiro. São divididas em dois grupos principais, a leishmaniose tegumentar, variando de lesões ulcerativas, papulares, à forma mucocutânea, provocando deformidades e incapacidade do indivíduo e a leishmaniose visceral, a forma mais grave e fatal da doença, que acomete órgãos internos como baço e fígado e medula (Bennis et al., 2018; Berbert et al., 2018; Aronson et al., 2019).

Ainda que as leishmanioses possuam um perfil epidemiológico importante, a linha de fármacos usada como referência para o tratamento está longe de ser adequada. O fato deve-se à diversidade de efeitos adversos graves e ao aumento do número de casos de resistência do parasito, fazendo com que o seu uso seja limitado (Borborema et al., 2019). Os antimoniais pentavalentes são utilizados como primeira escolha na terapêutica das leishmanioses desde a década de 40. São fármacos tóxicos e com inúmeros efeitos adversos como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e pancreatite. Os fármacos de segunda escolha, como a anfotericina B, miltefosina, paramomicina, pentamidina, são utilizados em casos de resistência aos

antimoniais, mas são ainda mais tóxicos do que estes (Marques et al., 2019; Terreros et al., 2019). Portanto, há uma necessidade global no desenvolvimento de novos tratamentos para as leishmanioses.

Em trabalhos anteriores, nosso grupo de pesquisa realizou estudo de atividade antileishmania com o óleo essencial de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), conhecida popularmente como pitangueira no Brasil, e encontrou resultados promissores com CI_{50} de 1,75 µM e 1,92 µM sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente (Rodrigues et al., 2013). Através da análise química por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) do óleo essencial foi encontrado o sesquiterpeno oxigenado curzereno como constituinte majoritário e representando 47,3 % do óleo essencial. Considerando a alta taxa de inibição do parasito pelo óleo essencial de *E. uniflora* e a presença em grande quantidade de curzereno no óleo, este trabalho teve como objetivo investigar a atividade antileishmania do curzereno bem como determinar sua citotoxicidade em células mamíferas e os mecanismos moleculares de ação.

2 Material e Métodos

2.1 Produtos químicos e fármacos

Meio de Schneider para insetos e meio *Dulbecco's Modified Eagle's* (DMEM); dimetilsulfóxido (DMSO 99 %), dodecilsulfato de sódio (SDS), brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio) (MTT), Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), reagente de Griess (1 % de sulfanilamida em H_3PO_4 a 10 % (v/v) em água Milli-Q), curzereno ($C_{15}H_{20}O$ 99 %; sua estrutura é mostrada na Fig. 1), antibióticos penicilina e estreptomicina, zimosan e vermelho neutro foram adquiridos na Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O kit de detecção de apoptose de anexina V-FITC / 7-AAD foi adquirido em Elabscience (St. Louis,

MO, EUA). Soro fetal bovino (SFB) inativado pelo calor foi adquirido da Cultilab (São Paulo, SP, Brasil). O antibiótico anfotericina B foi adquirido na Cristália (São Paulo, SP, Brasil). O antimoniato de meglumina (Glucantime®; 300 mg/mL) foi obtido na Aventis Pharma (São Paulo, SP, Brasil).

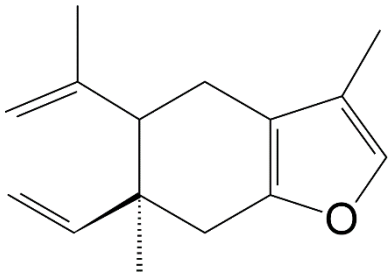

Fig. 1. Estrutura química do curzereno

2.2 Manutenção de parasitos e macrófagos

Parasitos da espécie *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram utilizados para a determinação da atividade antileishmania. As células foram cultivadas em meio Schneider, pH 7, suplementado (20 % de SFB e 1 % de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 μg/mL) e incubadas à 26 °C em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD). A obtenção das formas amastigotas axênicas se deu por meio da transformação das formas promastigotas, diminuindo o pH para 4,6 e elevando a temperatura para 32 °C. (Carvalho et al., 2017; Chanmol et al., 2019).

Macrófagos RAW 264.7, cedidos pelo Prof. Virmondes Rodrigues Jr da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM, foram cultivados em meio DMEM, pH 7,2, suplementado (10 % de SFB e 1 % de penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 μg/mL) e incubados à 37 ºC e 5 % de CO_2. A manutenção foi realizada a cada dois dias ou quando as células atingissem a confluência (Ghasemi et al., 2019).

2.3 Atividade antileishmania sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas

A atividade antileishmania sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas foi avaliada usando o ensaio colorimétrico do MTT. Promastigotas ou amastigotas axênicas em fase logarítmica de crescimento foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços a 1 x 10^6 parasitas por poço em 100 µL de meio Schneider suplementado em concentrações de 1,56 a 50 µMde curzereno, previamente diluído em DMSO e os medicamentos de referência, antimoniato de meglumina 200 a 40000 µM e anfotericina B 0,031 a 2 µM. As placas foram incubadas por 72 h em BOD a 26 ºC. A seguir foram adicionados 10 µL de MTT às placas (concentração final de 5 mg/mL) e as células foram incubadas por mais 4 h. Ao final do processo, foram adicionados 50 µL de SDS a 10 % para solubilização dos cristais de formazan. As absorbâncias foram medidas usando um leitor de placa ELISA (BioSystems modelo ELx800, Curitiba, PR, Brasil) a 540 nm (De Castro Oliveira et al., 2017).

145145

2.3.1 Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas

Promastigotas (1 x 10^6) em fase de crescimento logarítmico foram incubadas com concentrações correspondentes a 1x, 2x e 4x o CI_{50} do curzereno por 4 h. A seguir foram lavados três vezes em PBS frio e ressuspensos em tampão de ligação (HEPES 10 mM, 140 mM NaCl e $CaCl_2$ 2,5 mM, pH 7,4) de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida as células foram coradas com o kit de detecção de apoptose Anexina V-FITC/7-AAD (St. Louis, MO, EUA), células viáveis permaneceram sem coloração. Células coradas com Anexina V-FITC/7-AAD foram analisadas usando um citômetro de fluxo BD FACSCanto® II (BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). No total, 30.000 células foram analisadas por medição. Os dados foram analisados por meio do software FlowJo 10.0.7 TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA (Rodrigues et al., 2015b)

2.3.2 Avaliação morfológica de formas promastigotas por Microscopia de força atômica (MFA)

Promastigotas em fase de crescimento logarítmico ($1x10^6$) foram incubadas com concentrações correspondentes a 1x, 2x e 4x o CI_{50} do curzereno por 24 h no mesmo meio usado para o crescimento celular. Após esse período, as leishmanias foram centrifugadas (1,100 x g por 15 min em temperatura ambiente) e foram lavadas duas vezes com PBS e fixadas com 2,5 % (v/v) glutaraldeído em tampão de fosfato 0,1 M, pH 7,2, por 60 min. A MFA foi realizada utilizando o equipamento TT-AFM (AFM Workshop – EUA) no modo contato intermitente, com pontas TED PELLA (TAP300-G10) em uma frequência de ressonância de aproximadamente 242 kHz (Eaton, 2014).

2.4 Determinação da citotoxicidade sobre macrófagos

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em placas de 96 poços utilizando o ensaio colorimétrico do MTT. Aproximadamente 5 x 10^5 macrófagos RAW 264.7 por poço foram incubados em 100 µL de meio DMEM suplementado a 37 °C e 5 % de CO_2 por 4 h para adesão celular. Células não aderentes foram removidas por lavagem com meio DMEM puro. A seguir foi adicionado novo meio DMEM suplementado contendo concentrações de 3,12 a 400 µM de curzereno e dos fármacos de referência, antimoniato de meglumina (200 – 40000 µM) e anfotericina B (0,031 a 2 µM) foram incubados a 37 ºC com 5 % de CO_2 durante 72 h. Após a incubação, a citotoxicidade foi avaliada pela adição de 10 µL de MTT (5 mg/mL). O sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100 µL de DMSO. Finalmente, a absorbância a 540 nm foi medida utilizando um leitor de placas ELISA (Amlabu et al., 2020).

2.5 Atividade antileishmania contra amastigotas intramacrofágicas

Macrófagos RAW 264.7 foram semeados em placas de cultura com 24 poços a uma concentração de 1 x 10^5 células/mL em 1 mL de meio DMEM suplementado, contendo lamínulas circulares estéreis de 13 mm. As placas de cultura foram incubadas a 37 ºC e 5 % de CO_2 por 3 h para adesão celular. A seguir foram realizadas três lavagens com PBS estéril para retirada de células não aderidas. Os macrófagos foram então incubados com um novo meio contendo promastigotas (em fase estacionária) na proporção de dez promastigotas para um macrófago, a 5 % de CO_2 e 37 ºC por 4 h. O meio foi subsequentemente aspirado para remover parasitos não internalizados e os poços foram lavados com PBS. Por conseguinte, os macrófagos infectados foram incubados com as concentrações de 3,12 a 25 µM de curzereno, 200 a 40000 µM do antimoniato de meglumina e 0,031 a 2 µM de anfotericina B. As concentrações do curzereno foram observadas para não serem tóxicas para macrófagos por 72 h. Após este período, as lamínulas foram removidas e coradas com kit de coloração panótica. Para cada lamínula, cerca de 300 macrófagos foram contados microscopia óptica (Dias et al., 2020).

2.6 Atividade lisossomal

Macrófagos RAW 264.7 (1 x 10^5 células por poço) foram plaqueados e incubados com curzereno em diluições seriadas de 3,12 a 25 µM por 72 h a 37 °C e CO_2 a 5 %. Em seguida foram adicionados 10 µL de solução de vermelho neutro e incubados por 30 min. Depois o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com PBS a 37 °C e foram adicionados 100 µL de solução de extração (ácido acético glacial a 1 % v/v e etanol a 50 % v/v dissolvido em bidestilada água) para solubilizar o vermelho neutro dentro das vesículas de secreção

lisossômica. Após 30 min em um agitador Kline (modelo AK 0506), a absorbância a 540 nm foi lida em um leitor de placas de ELISA (Dias, et al.,2020)

2.7 Capacidade fagocítica

Macrófagos RAW 264.7 (1 x 10^5 células por poço) foram plaqueados e incubados com curzereno em diluições seriadas de 3,12 a 25 µM por 72 h a 37 °C e CO_2 a 5 %. Posteriormente foi adicionado 10 µL de zimosan corado com vermelho neutro como realizado por Jakhar et al., 2018, com algumas modificações. Após 30 min de incubação, o sobrenadante foi removido e 100 µL de fixador de Baker (formaldeído 4 % v/v, cloreto de sódio 2 % p/v e acetato de cálcio de 1 % w/v em água destilada) foi adicionado para parar a fagocitose do zimosan. Passados 30 min, as células foram lavadas com PBS para remover o que não foi fagocitado pelos macrófagos. A solubilização foi feita pela adição da solução de extração em um agitador Kline. A seguir as absorbâncias foram lidas a 540 nm usando um leitor de placas ELISA.

2.8 Avaliação da produção de óxido nítrico (NO)

A produção de NO foi avaliada usando o sobrenadante do ensaio de infecção dos macrófagos RAW 264.7 (item 2.5) pelo método de Griess. Os sobrenadantes a serem avaliados foram distribuídos em placas de 96 poços juntamente com concentrações em série (2-125 µM) de $NaNO_2$ em meio DMEM, para ser realizado a curva padrão. Reagente de Griess foi então adicionado e deixado 10 min à temperatura ambiente. A reação colorimétrica foi determinada a 540 nm por espectrofotômetro. A concentração de nitrito foi estimada por interpolação da curva padrão (Amorim et al., 2013).

2.9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em 3 experimentos independentes. As diferenças entre os grupos foram analisadas por ANOVA unidirecional com teste post-hoc de Tukey usando o software GraphPad Prism® versão 7.0, considerando o valor de $p < 0,05$ como estatisticamente significativo. Os valores da concentração inibitória média (CI_{50}), concentração efetiva média (CE_{50}) e os valores da concentração de citotoxicidade média (CC_{50}), com intervalos de confiança de 95 %, foram calculados usando regressão não linear no software GraphPad Prism®.

3 Resultados

3.1 Avaliação da atividade antileishmania do curzereno sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas.

A atividade antileishmania do curzereno foi avaliada em culturas de promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e os resultados estão presentes na Fig. 2 e Tabela 1. O curzereno inibiu o crescimento de formas promastigotas em todas as concentrações testadas, com redução de 19,12 %, 54,5 %, 67,42 % e 100 % nas concentrações de 3,12 µM, 6,25 µM, 12,5 µM e 25 µM, respectivamente (Fig. 2A), resultando em uma CI_{50} de 3,09 µM (Tabela 1). Na avaliação da atividade contra formas amastigotas axênicas foi observada uma inibição de crescimento significativo ainda maior promovido pelo curzereno, com taxas de inibição de 44,8 % e 65,37 % nas concentrações de 3,12 µM, 6,25 µM, respectivamente, chegando a 100 % de inibição nas duas maiores concentrações (12,5 µM e 25 µM) (Fig. 2B) e CE_{50} de 2,56 µM (Tabela 1).

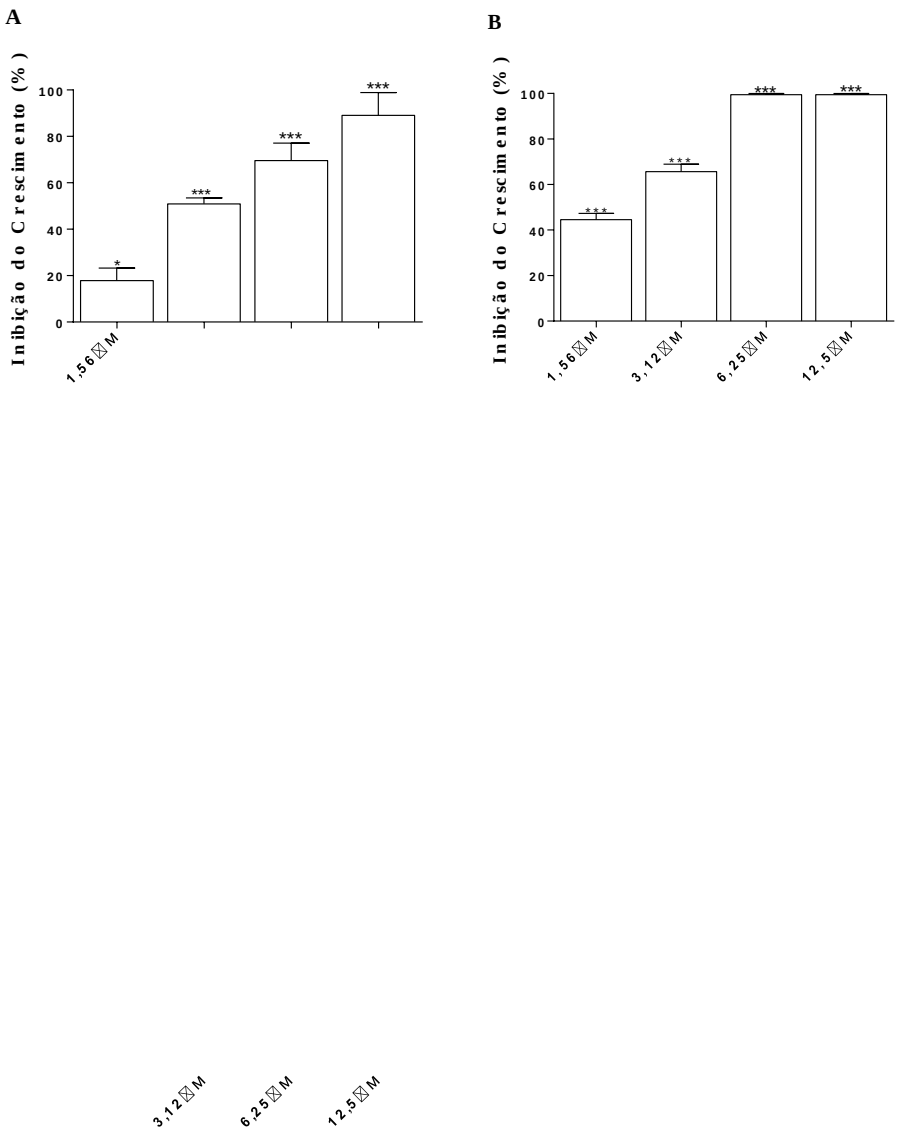

Fig. 2. Efeito do curzereno sobre formas promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B) de *Leishmania amazonensis*. Culturas em fase logarítmica de crescimento (1 x 10^6) foram incubadas à 26 ºC (promastigotas) e 32 ºC (amastigotas) por 72 h com o curzereno e a atividade antileishmania foi avaliada usando o ensaio colorimétrico do MTT. Os resultados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes realizadas em triplicata. (*) p <0,05 vs. controle; (**) p <0,01 vs. controle; (***) p <0,001 vs. controle.

Tabela 1. Atividade antileishmania, efeito citotóxico contra macrófagos e valores do índice de seletividade (IS) calculados para o curzereno, antimoniato de meglumina e anfotericina B.

Compostos	**RAW 264.7**	**Promastigotas**		**Amastigotas axênicas**		**Amastigotas intramacrofágicas**	
	CC_{50} µM	**CI_{50} µM**	**SI**	**CE_{50} µM**	**SI**	**CC_{50} µM**	**SI**
Curzereno	83,87	3,09	27,14	2,56	32,76	0,46	182,32
Anfotericina B	0,39	0,35	1,11	0,51	0,76	0,093	4,19
Antimoniato de meglumina	15863	21502	0,73	1730	9,16	492,6	32,20

IS (índice de seletividade) = CC_{50}/CI_{50} ou CE_{50}

3.2. Avaliação do perfil de morte celular de formas promastigotas

Os resultados da marcação com Anexina V-FITC e 7-AAD estão plotados na Fig. 3. As células marcadas com +Anexina V/-7AAD representam as células em apoptose inicial (Fig. 3A), +Anexina V/+7AAD representam células em apoptose tardia (Fig. 3B) e as marcadas com –Anexina V/-7AAD representam as células necróticas (Fig. 3C). No gráfico A foi observado um aumento significativo no número de células em apoptose inicial na concentração de 4x CI_{50}, no qual o de 4x CI_{50} representa 12,36 µM. No gráfico B (células em apoptose tardia) houve um aumento significativo em todas as concentrações testadas, no valor do CI_{50} (3,09 µM); 2x CI_{50}

(6,18 µM) e 4x CI_{50} (12,36 µM). Já no gráfico C, células necróticas, não foi observada alteração em relação ao controle negativo.

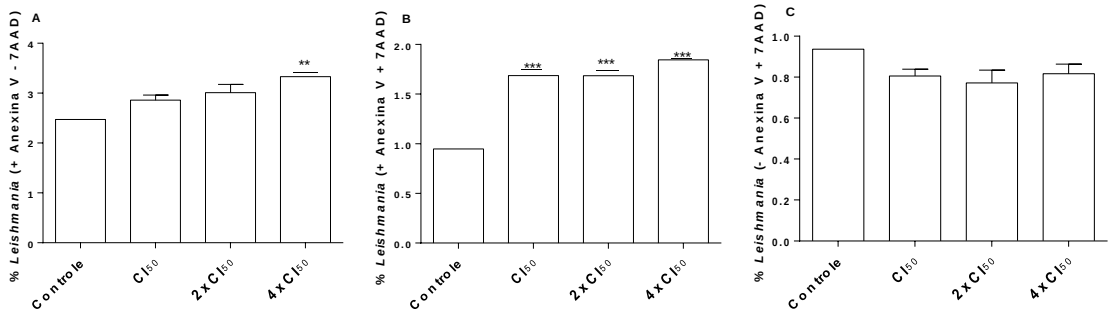

Fig. 3: Análise de citometria de fluxo de promastigotas de *Leishmania amazonensis*. As células foram incubadas a 26 ºC por 4 h presença do curzereno nas concentrações de CI_{50}, 2x CI_{50} e 4x CI_{50}. Foi realizada dupla marcação com Anexina V/7AAD e as células foram analisadas por citometria de fluxo. Os dados representam a média ± erro padrão de três experimentos independentes realizadas em triplicata; (*) p <0,05 vs controle; (**) p <0,01 vs controle; (***) p <0,001 vs controle.

3.3. Estudos morfológicos de formas promastigotas tratadas com curzereno

No presente trabalho as características morfológicas de promastigotas tratadas com o curzereno foram observadas por meio de MFA. Em células não tratadas foi observada uma textura superficial normal, intacta da membrana plasmática, formato alongado e fusiforme e a presença de um flagelo (Fig. 4A e 4B), confirmando a normalidade celular. No entanto, a ultraestrutura da superfície celular foi alterada topograficamente após o tratamento com curzereno nas concentrações CI_{50} (Fig. 4C e 4D), 2x CI_{50} (Fig. 4E e 4F) e 4x CI_{50} (Fig. 4G e 4H). Foram observadas algumas anormalidades como invaginações, globulações, rupturas e formação de poros de membrana plasmática. As alterações observadas indicam desajuste na maturidade celular sugerindo um efeito leishmanicida, por afetar não somente o crescimento celular, mas também causarem a morte do parasito.

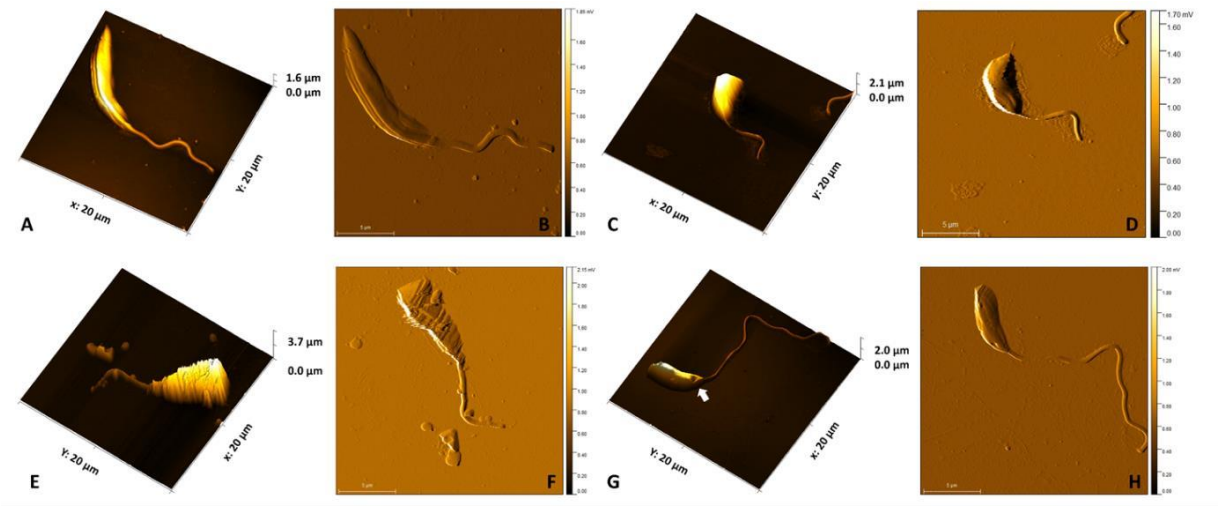

Fig 4: Análise morfológica de *Leishmania amazonensis* por Microscopia de Força Atômica (direita: imagens de amplitude em 2D; esquerda: imagens de altura em 3D). **A** e **B**: controle (não tratado); **C** e **D**: tratado com curzereno (CI_{50}); **E** e **F**: tratado com curzereno (2× CI_{50}); **G** e **H**: tratado com curzereno (4× CI_{50}). Seta branca: poro na membrana.

3.4. Avaliação da citotoxicidade do curzereno sobre macrofágos RAW 267.4

Os resultados da citotoxicidade do curzereno sobre macrófagos RAW 267.4 estão plotados na Fig. 5. Foi observado que nas concentrações de 3,12; 6,25; 12,5 e 25 µM os macrófagos mantiveram uma viabilidade próximo a 100 %. No entanto, nas concentrações de 50 µM, 100 µM, 200 µM e 400 µM houve uma diminuição de 90,39 %, 94,7 %, 99,35 % e 98,11 %, respectivamente. Através destes resultados foi possível calcular a CC_{50} do curzereno no valor de 83,87 µM (Tabela 1).

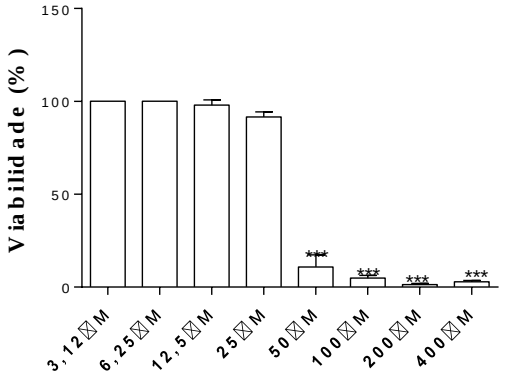

Fig. 5: Efeitos citotóxicos do curzereno sobre macrófagos RAW 264.7. Macrófagos (5 x 10^5) foram incubados a 37 ºC e 5 % de CO_2 durante 72 h com diferentes concentrações de curzereno. A citotoxicidade foi avaliada pelo teste do MTT. Os resultados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes realizadas em triplicata. (***) p <0,001 vs. controle.

3.5. Avaliação do curzereno sobre a infecção de macrófagos RAW 264.7 por L. amazonensis

Os resultados referentes ao tratamento dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* com curzereno foram apresentados através de três parâmetros: porcentagem de macrófagos infectados, número de amastigotas/macrófagos e índice de infecção de macrófagos e estão presentes na Fig. 6.

No que diz respeito à porcentagem de macrófagos infectados, foi possível observar que o curzereno diminuiu a taxa de infecção de macrófagos em todas as concentrações testadas, com 58,64 %, 71,1 %, 86,58 % e 93,25 % de redução nas concentrações de 3,12 µM, 6,25 µM, 12,5 µM e 25 µM, respectivamente, quando comparados ao controle negativo (Fig. 6A). Adicionalmente, a Fig. 6D demonstra uma representação qualitativa do efeito do curzereno sobre a infecção de macrófagos, no qual pode ser observado uma diminuição gradual da carga parasitária com o aumento da concentração e a integridade preservada dos macrófagos após 72 h de tratamento com diferentes concentrações.

No segundo critério avaliado, número de amastigotas por macrófago infectado, o

tratamento com curzereno resultou em uma redução significativa do número de amastigotas nas quatro concentrações avaliadas. Observou-se redução de 62,4 %, 67,96 %, 70,3 % e 86,51 % nas concentrações de 3,12 µM, 6,25 µM, 12,5 µM e 25 µM, respectivamente (Fig. 6B).

No que diz respeito ao índice de infecção, parâmetro que avalia a união dos parâmetros anteriores, observou-se redução mediante o tratamento com curzereno em todas as concentrações. Esta redução foi de 84,49 %, 87,8 %, 92,16 % e 96,6 % nas concentrações de 3,12 µM, 6,25 µM, 12,5 µM e 25 µM, respectivamente (Fig. 6C).

A partir dos resultados encontrados com a análise da redução do índice de infecção pelo tratamento com o curzereno, foi calculado a CE_{50} para formas amastigotas intramacrofágicas, com o valor de 0,46 µM (Tabela 1), constatando-se uma maior atividade do curzereno sobre amastigotas intramacrofágicas do que amastigotas axênicas. Além disso, os resultados demonstraram uma maior efetividade do curzereno sobre o fármaco de referência antimoniato de meglumina que apresentou CE_{50} de 492,6 µM (Tabela 1).

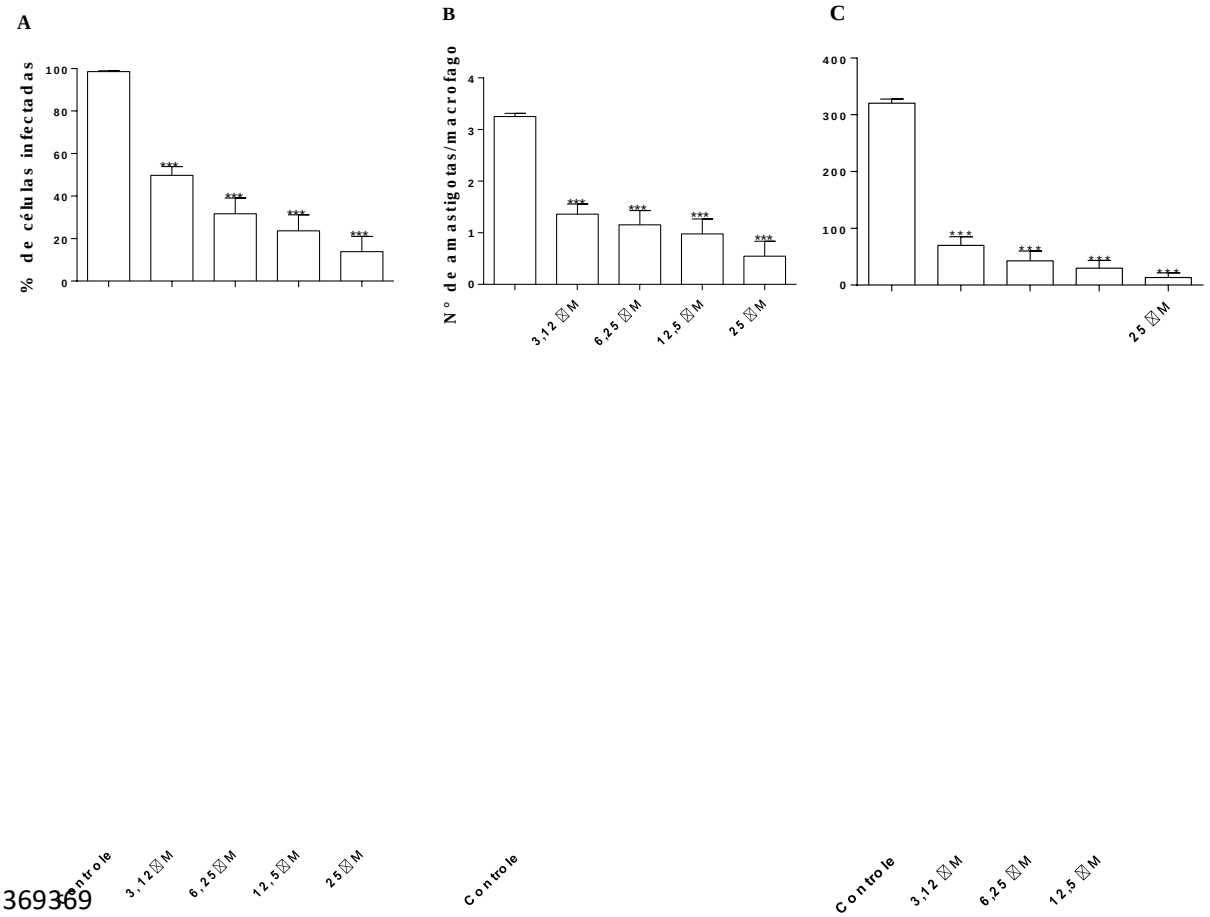

Fig. 6. Atividade antileishmania do curzereno contra formas amastigotas intramacrofágicas após 72 h de exposição. (A) porcentagem de infecção; (B) número de amastigotas por macrófagos; (C) índice de infecção; (D) Imagens de microscopia óptica de macrófagos RAW 264.7 infectados e tratados com curzereno, observados a uma amplificação de 1000 x. Macrófagos RAW 267 ($1x10^5$) foram infectados com formas promastigotas na proporção de 10:1 macrófagos e tratados com curzereno a 5 % de CO_2 e 37 °C por 72h. Os resultados representam média ± erro padrão de três experiências independentes realizadas em triplicata. (***) $p < 0,001$ vs. controle.

3.6. Avaliação da capacidade fagocítica e volume lisossomal

A Fig. 7. apresenta os resultados referentes à avaliação da atividade lisossomal e fagocítica. É possível observar que o curzereno aumentou a atividade lisossomal nas concentrações de 3,12; 6,25 e 12,5 µM, em relação ao controle negativo (Fig. 7A). No entanto, não alterou a fagocitose do zimosan, observado nos níveis de absorbância em relação ao controle (Fig. 7B).

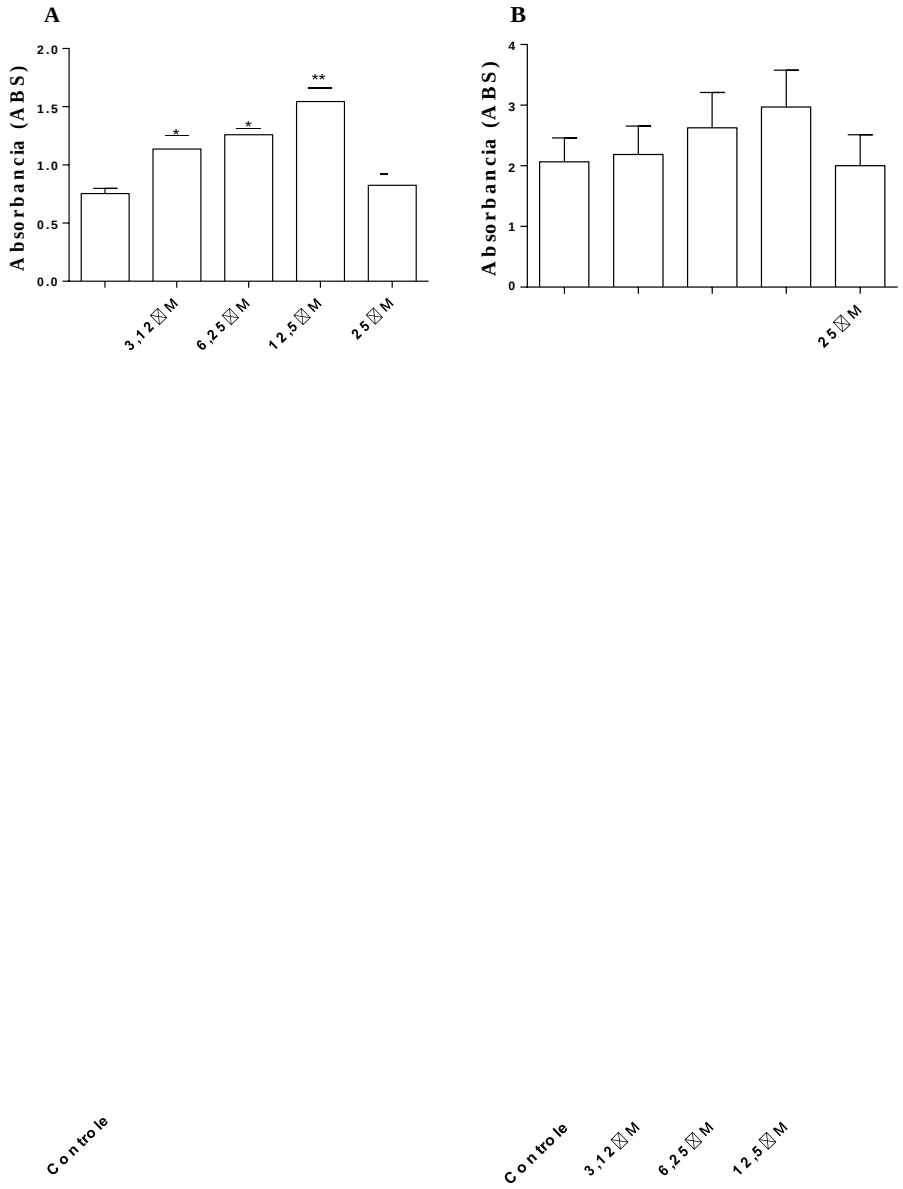

Fig. 7. Avaliação do volume lisossomal (A) e capacidade fagocítica (B). Os macrófagos RAW 264.7 foram tratados com concentrações seriadas por 72 h. A atividade lisossômica foi analisada pelo aumento de retenção de vermelho neutro (NR) após solubilização com solução de extração. A fagocitose foi analisada por incorporação de zimosan corado com vermelho neutro, solubilizado pela solução de extração. Os resultados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados

em triplicata. (*) p <0,05 vs. ao controle; (**) p <0,01 vs. ao controle.

3.7. Avaliação da produção de óxido nítrico

Os resultados referentes ao ensaio de NO estão plotados na Fig. 8. Foi possível observar um aumento nos níveis de NO produzidos por macrófagos tratados com o curzereno na concentração de 12,5 e 25 µM em relação ao controle negativo. No qual na concentração de 25 µM foi observado um aumento maior em relação ao controle positivo, nesse caso sendo o LPS o controle positivo.

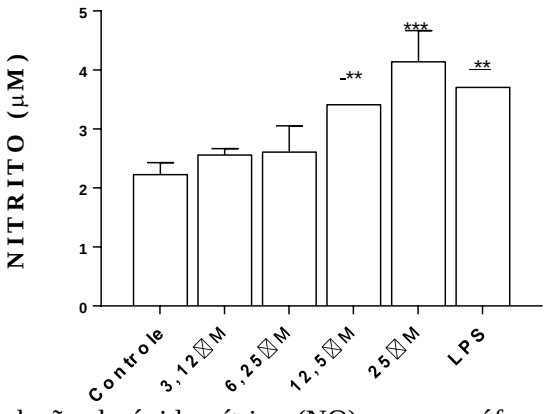

Fig. 8. Avaliação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos tratados com o curzereno. A produção de NO foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de Griess em cultura de macrófagos RAW 264.7 infectados e tratados por 72 h a 37 °C e 5 % de CO_2. Os resultados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em triplicata. (**) p <0,01 vs. ao controle; (***) p < 0,001 vs. ao controle. LPS – lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* a 2 µg/mL.

4. Discussão

Na busca por tratamentos mais efetivos e seguros para as leishmanioses, pesquisas envolvendo os óleos essenciais e seus constituintes mostraram-se bastante promissoras. Alguns óleos essenciais de espécies como *E. uniflora* (Rodrigues et al., 2013), *Eugenia pitanga* (O. Berg) Nied. (Kauffmann et al., 2017), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Carvalho et al., 2017), *Myrciaria plinioides* D. Legrand (Kauffmann et al., 2019); e *Campomanesia xanthocarpa* Mart. ex O. Berg (Ferreira et al., 2020) têm apresentado atividade antileishmania contra diferentes formas do parasito por meio de pesquisas *in vitro* e *in vivo*. Além da mistura complexa que são os óleos essenciais, muitos autores relataram atividade antileishmania promissora de seus constituintes majoritários, como α-pineno (Rodrigues, et al., 2015a) e guaiol (Garcia et al., 2018), o que torna os óleos essenciais substâncias privilegiadas na busca de novos agentes antileishmania (Essid et al., 2015; Andrade et al; Bernuci et al., 2016; Silva et al., 2017).

O curzereno é um sesquiterpeno de forma molecular $C_{15}H_{20}O$ e peso molecular de 216,32 g/mol. São poucos os relatos de sua atividade biológica, sendo reportado efeitos anti-inflamatórios e antitumorais (Wang et al., 2017). Foi originalmente isolado das raízes de

Curcuma longa L., uma espécie da medicina tradicional chinesa e que tem óleo essencial reconhecidamente antileishmania, bem como encontrado como constituinte majoritário do óleo essencial da espécie antileishmania *E. uniflora* (Rodrigues et al., 2013; Wang et al., 2017). Apesar de ser encontrado na composição química de óleos essenciais antileishmania, seu potencial sobre espécies do gênero *Leishmania* ainda não havia sido explorado, sendo o objetivo do presente trabalho.

Os estudos biológicos iniciaram com a avaliação da inibição de crescimento de formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Baseado nos valores de CI_{50} e CE_{50} obtidos para o curzereno, observou-se uma maior efetividade deste composto sobre outros sesquiterpenos relatados na literatura como agentes antileishmania promissores. Por exemplo, o nerolidol, com CI_{50} de 85,22 µM para formas promastigotas e 67,73 µM para amastigotas axênicas de *L. amazonensis* (Arruda et al., 2005); artemisinina, uma lactona sesquiterpênica com CI_{50} de 4,2 µM para amastigotas de *L. amazonensis* (Machin et al., 2020); e (-) -α-bisabolol com CI_{50} de 26,6 µM contra as formas promastigotas da espécie *L. tropica* (Corpas-López et al., 2016).

Uma vez constatada a atividade antileishmania do curzereno, investigou-se a citotoxicidade sobre macrófagos RAW 264.7. A investigação da citotoxicidade sobre macrófagos é importante, pois são as principais células parasitadas por *Leishmania* sp., e todos os fármacos antileishmania disponíveis são altamente tóxicos. Um novo candidato a fármaco antileishmania para ser considerado promissor, deve eliminar o parasito sem causar danos à célula hospedeira (Rodrigues et al., 2015a). Muitos estudos recomendam que o índice de seletividade deve ser acima de 20 (Evans et al., 2001; Nwaka et al., 2006). No presente trabalho foram encontrados índices de seletividade satisfatórios para o curzereno, com destaque para o índice de seletividade referente à amastigotas intracelulares, no valor de 182,32. Quando

comparado aos fármacos de referência, o curzereno demonstrou ser 43,52 vezes mais seletivo que o antimoniato de meglumina e 5,66 mais seletivo que a anfotericina B.

No presente estudo foi demonstrado que o curzereno possui efeitos diretos sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Com intuito de se avaliar o mecanismo de morte celular causado pelo curzereno foi utilizado a coloração com Anexina V-FITC/7AAD (Rodrigues et al., 2020). Anexina V é comumente utilizada para marcar a externalização da fosfatidilserina, que é um componente fosfolipídico mantido no lado citosólico das membranas celulares. Quando uma célula entra no estado de morte celular programada (apoptose), a fosfatidilserina é translocada e exposta na superfície da célula (Tavares et al., 2005; Dutta et al., 2007; Bahrami et al., 2016). A coloração com 7AAD é indicativo de morte celular por necrose uma vez que o 7AAD é um composto químico fluorescente com forte afinidade pelo DNA e que não passa facilmente através de membranas celulares intactas, sendo necessária a ruptura destas estruturas (Santos et al., 2008). O curzereno após 4 h de tratamento aumentou o número de células marcadas apenas com anexina V e o número de células com marcação dupla com anexina V e 7AAD indicando que o constituinte induz morte celular por apoptose com uma secundária morte por necrose. O tempo curto de incubação se deu ao fato de que a lise total das formas promastigotas torna impossível realizar a citometria de fluxo de apoptose/necrose (Ardestani et al., 2012).

Além da análise por citometria de fluxo, os danos causados pelo curzereno sobre a integridade de formas promastigotas do parasito foram avaliados pela MFA. Foi observado anormalidades no formato celular após o tratamento, bem como diminuição do tamanho celular. Estas alterações geralmente são associadas à condensação da cromatina e fragmentação do DNA sendo sugestivas de morte celular programada (Rodrigues et al., 2020). Além disso outras alterações observadas como a formação de poros na membrana plasmática do parasito são

sugestivas de morte celular por necrose (Rodrigues et al., 2020). Os danos à membrana plasmática juntamente com a marcação por 7AAD sugerem que o efeito de curzereno sobre o parasito é do tipo leishmanicida.

A preferência para que seja minimizado o uso de animais em laboratórios, tem guiado o desenvolvimento de métodos alternativos *in vitro* que devem ser usados sempre que possível, não apenas nas avaliações da ação farmacológica, mas também nos estudos de avaliação da toxicidade de novos compostos. A utilização de modelos experimentais de amastigotas axênicas de *leishmania* são importantes, pois essas formas são responsáveis pelas manifestações clínicas das leishmanioses (Rodrigues et al., 2015a). Os modelos com a forma intracelular fornecem o método mais eficiente para relacionar a atividade *in vitro* de um fármaco com sua eficácia no ensaio *in vivo* (Mahmoudvand et al., 2015; Dezaki et al., 2016).

Em nosso estudo foi observado uma maior atividade do curzereno sobre formas amastigotas intramacrofágicas do que formas promastigotas e amastigotas axênicas, indicando a ativação das atividades microbicidas dos macrófagos (Do Carmo Maquiaveli et al., 2017). Para exercer suas atividades microbicidas, os macrófagos desenvolvem mecanismos estruturais (fagocitose, vacuolização e aumento do volume lisossomal) e celulares (alterações no perfil de NO, níveis alterados de citocinas) (Schiessel et al; Bonatto et al., 2015). No presente trabalho, foi avaliado dois mecanismos estruturais de atividade antileishmania (atividades lisossomal e fagocítica). Nossos resultados mostraram que curzereno aumentou o tamanho de compartimentos endocíticos onde parasitos do gênero *Leishmania* são degradados, sugerindo a participação desse mecanismo na sua atividade antileishmania. Por outro lado, o curzereno não alterou de forma significativa a capacidade fagocítica, sugerindo independência desse mecanismo em sua ação antiparasitária.

No presente estudo foi observado ainda que a diminuição da taxa de infecção de macrófagos tratados com curzereno foi associada ao aumento da produção de NO. A produção de NO é um importante mecanismo envolvido na atividade leishmanicida dos macrófagos e pode ser medido por meio de seus produtos oxidados, como o nitrito (Ventura et al., 2015). NO é sintetizado pela enzima iNOS após ativação de citocinas Th1 como interferon-γ (IFN-γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (Rodrigues et al., 2015b). Trabalhos anteriores têm demonstrado que a atividade anti-*Leishmania amazonensis in vitro* e *in vivo* é associada como a combinação de NO com o ânion superóxido, gerando peroxinitrito ($ONOO^-$), um agente altamente leishmanicida presente dentro do fagolisossomo (Horta et al., 2012).

5. Conclusão

Baseado nos resultados encontrados pode-se constatar que o curzereno possui atividade antileishmania efetiva e seletiva sobre as duas formas de *L. amazonensis*, atuando por mecanismos diretos e indiretos. Foi verificado que efeitos diretos do curzereno sobre o parasito envolvem a externalização da fosfatidilserina e a presença de poros na membrana plasmática indicando morte celular por apoptose com secundária morte por necrose. Os efeitos indiretos foram observados sobre a forma amastigota intracelular, associada ao estado de ativação macrofágica observado no aumento do volume lisossomal e níveis de NO. Esses achados apoiam a conclusão de que o curzereno é um constituinte promissor para ser avaliado sobre modelos *in vivo* de leishmaniose tegumentar, para o desenvolvimento de novos agentes antileishmania.

Conflitos de interesse

Os autores confirmam que não há conflitos de interesse.

Declaração de contribuição de autoria

Thaís Amanda Lima Nunes: Investigação, Conceitualização, Metodologia, Análise de Dados, Redação. **Malu Mateus Santos**: Investigação. **Mariana Silva de Oliveira**: Investigação. **Julyanne Maria Saraiva de Sousa**: Investigação. **Alyne Rodrigues de Araújo**: Investigação. **Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira**: Investigação. **Gustavo Portela Ferreira**: Investigação. **Virmondes Rodrigues Junior**: Investigação. **Marcos Vinícius da Silva**: Investigation. **Klinger Antonio da Franca Rodrigues**: Investigação, Conceitualização, Metodologia, Obtenção de Dados, Redação, Aquisição de Recursos, Administração do Projeto.

Agradecimentos

Este trabalho foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (número de consessão 446274/2014-3).

Referências

Amlabu, W.E., Antwi, C.A., Awandare, G., Gwira, T.M., 2020. Elucidating the possible mechanism of action of some pathogen box compounds against *Leishmania donovani*. PLoS Negl. Trop. Dis. 14, e0008188. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008188

Amorim, F.M., Rodrigues, Y.K.S., Barbosa, T.P., Néris, P.L.N., Caldas, J.P.A., Sousa, S.C.O., Leite, J.A., Rodrigues-Mascarenhas, S., Vasconcellos, M.L.A.A., Oliveira, M.R., 2013. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against Leishmania (Viannia) braziliensis associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. Parasitology 140, 29–38. https://doi.org/10.1017/S0031182012001291

Andrade, M.A., Azevedo, C. dos S., Motta, F.N., Santos, M.L. dos, Silva, C.L., Santana, J.M. de, Bastos, I.M.D., 2016. Essential oils: In vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. BMC Complement. Altern. Med. 16, 1–8. https://doi.org/10.1186/s12906-016-1401-9

Ardestani, S.K., Poorrajab, F., Razmi, S., Foroumadi, A., Ajdary, S., Gharegozlou, B., Behrouzi-Fardmoghadam, M., Shafiee, A., 2012. Cell death features induced in *Leishmania major* by 1,3,4-thiadiazole derivatives. Exp. Parasitol. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.002

585 Aronson, N.E., Joya, C.A., 2019. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and
586 Management. Infect. Dis. Clin. North Am. 33, 101–117.
587 https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.004

588 Arruda, D.C., D'Alexandri, F.L., Katzin, A.M., Uliana, S.R.B., 2005. Antileishmanial activity
589 of the terpene nerolidol. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 1679–1687.
590 https://doi.org/10.1128/AAC.49.5.1679-1687.2005

591 Bahrami, S., Khademvatan, S., Razi Jalali, M.H., Pourbaram, S., 2016. Amiodarone triggers
592 induction of apoptosis in cutaneous leishmaniasis agents. Pathog. Glob. Health 110,
593 200–204. https://doi.org/10.1080/20477724.2016.1220732

594 Bennis, I., De Brouwere, V., Belrhiti, Z., Sahibi, H., Boelaert, M., 2018. Psychosocial burden
595 of localised cutaneous Leishmaniasis: A scoping review. BMC Public Health 18, 1–12.
596 https://doi.org/10.1186/s12889-018-5260-9

597 Berbert, T.R.N., Mello, T.F.P. De, Wolf Nassif, P., Mota, C.A., Silveira, A.V., Duarte, G.C.,
598 Demarchi, I.G., Aristides, S.M.A., Lonardoni, M.V.C., Vieira Teixeira, J.J., Silveira,
599 T.G.V., 2018. Pentavalent antimonials combined with other therapeutic alternatives for
600 the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review.
601 Dermatol. Res. Pract. 2018 ttps://doi.org/10.1155/2018/9014726

602 Bernuci, K.Z., Iwanaga, C.C., Fernandez-Andrade, C.M.M., Lorenzetti, F.B., Torres-Santos,
603 E.C., Faiões, V.D.S., Gonçalves, J.E., Do Amaral, W., Deschamps, C., Scodro,
604 R.B.D.L., Cardoso, R.F., Baldin, V.P., Cortez, D.A.G., 2016. Evaluation of chemical
605 composition and antileishmanial and antituberculosis activities of essential oils of *Piper*
606 species. Molecules, 21, no. 12 https://doi.org/10.3390/molecules21121698

607 Biá Ventura, T., da Silva Machado, F., de Araujo, M., de Souza Gestinari, L., Kaiser, C.,
608 Esteves, F.A., Lasunskaia, E., Soares, A., Muzitano, M., 2015. Nitric oxide production
609 inhibition and anti-mycobacterial activity of extracts and halogenated sesquiterpenes
610 from the Brazilian red alga laurencia dendroidea J. Agardh. Pharmacogn. Mag. 11, 611.
611 https://doi.org/10.4103/0973-1296.172972

612 Bonatto, S.J.R., Yamaguchi, A.A., Coelho, I., Nunes, E.A., Iagher, F., Fukushima, J.I.,
613 Saboia, L. V., Fernandes, L.C., 2015. Fish oil reduces the proliferation of cells cultured
614 from human breast and colorectal tumours: An in vitro study. J. Funct. Foods.
615 https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.025

616 Boniface, P.K., Ferreira, E.I., 2019. Flavonoids as efficient scaffolds: Recent trends for
617 malaria, leishmaniasis, Chagas disease, and dengue. Phyther. Res. 33, 2473–2517.
618 https://doi.org/10.1002/ptr.6383

619 Borborema, S.E.T., Osso, J.A., De Andrade, H.F., Do Nascimento, N., 2019.
620 Pharmacokinetics of neutron-irradiated meglumine antimoniate in *Leishmania*
621 *amazonensis*-infected BALB/c mice. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 25, 1–9.
622 https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-1446-18

Braga, S.S., 2019. Multi-target drugs active against leishmaniasis: A paradigm of drug repurposing. Eur. J. Med. Chem. 183, 111660. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.111660

Carvalho, C.E.S., Sobrinho-Junior, E.P.C., Brito, L.M., Nicolau, L.A.D., Carvalho, T.P., Moura, A.K.S., Rodrigues, K.A.F., Carneiro, S.M.P., Arcanjo, D.D.R., Citó, A.M.G.L., Carvalho, F.A.A., 2017. Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Myracrodruon urundeuva* (Engl.) Fr. All.: Composition, cytotoxity and possible mechanisms of action. Exp. Parasitol. 175, 59–67. https://doi.org/10.1016/j.exppara.2017.02.012

Chanmol, W., Jariyapan, N., Somboon, P., Bates, M.D., Bates, P.A., 2019. Axenic amastigote cultivation and in vitro development of Leishmania orientalis. Parasitol. Res. 118, 1885–1897. https://doi.org/10.1007/s00436-019-06311-z

Charlton, R.L., Rossi-Bergmann, B., Denny, P.W., Steel, P.G., 2018. Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: The-state-of-the-art. Parasitology 145, 219–236. https://doi.org/10.1017/S0031182017000993

Corpas-López, V., Merino-Espinosa, G., Díaz-Sáez, V., Morillas-Márquez, F., Navarro-Moll, M.C., Martín-Sánchez, J., 2016. The sesquiterpene (−)-α-bisabolol is active against the causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis through the induction of mitochondrial-dependent apoptosis. Apoptosis 21, 1071–1081. https://doi.org/10.1007/s10495-016-1282-x

De Castro Oliveira, L.G., Brito, L.M., de Moraes Alves, M.M., Amorim, L.V., Sobrinho-Júnior, E.P.C., de Carvalho, C.E.S., da Franca Rodrigues, K.A., Arcanjo, D.D.R., das Graças Lopes Citó, A.M., de Amorim Carvalho, F.A., 2017. In vitro effects of the neolignan 2,3-dihydrobenzofuran against *Leishmania amazonensis*. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 120, 52–58. https://doi.org/10.1111/bcpt.12639

Dezaki, E.S., Mahmoudvand, H., Sharififar, F., Fallahi, S., Monzote, L., Ezatkhah, F., 2016. Chemical composition along with anti-leishmanial and cytotoxic activity of *Zataria multiflora*. Pharm. Biol. 54, 752–758. https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1079223

Dutta, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., Chatterjee, M., 2007. Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. J. Med. Microbiol. 56, 629–636. https://doi.org/10.1099/jmm.0.47039-0

Eaton, P., Bittencourt, C.R., Costa Silva, V., Véras, L.M.C., Costa, C.H.N., Feio, M.J., Leite, J.R.S.A., 2014. Anti-leishmanial activity of the antimicrobial peptide DRS 01 observed in Leishmania infantum (syn. Leishmania chagasi) cells. Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. https://doi.org/10.1016/j.nano.2013.09.003

Essid, R., Rahali, F.Z., Msaada, K., Sghair, I., Hammami, M., Bouratbine, A., Aoun, K., Limam, F., 2015. Antileishmanial and cytotoxic potential of essential oils from medicinal plants in Northern Tunisia. Ind. Crops Prod. https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.049

661 Evans, S.M., Casartelli, A., Herreros, E., Minnick, D.T., Day, C., George, E., Westmoreland,
662 C., 2001. Development of a high throughput in vitro toxicity screen predictive of high
663 acute in vivo toxic potential. Toxicol. Vitr. 15, 579–584. https://doi.org/10.1016/S0887-
664 2333(01)00064-9

665 Ferreira, F.B.P., Herculano Ramos-Milaré, Á.C.F., Gonçalves, J.E., Lazarin-Bidóia, D.,
666 Nakamura, C.V., Sugauara, R.R., Fernandez, C.M.M., Gazim, Z.C., Demarchi, I.G.,
667 Silveira, T.G.V., Lonardoni, M.V.C., 2020. Campomanesia xanthocarpa (Mart.) O. Berg
668 essential oil induces antileishmanial activity and remodeling of the cytoplasm organelles.
669 Nat. Prod. Res. 0, 1–5. https://doi.org/10.1080/14786419.2020.1827401

670 Garcia, M.C.F., Soares, D.C., Santana, R.C., Saraiva, E.M., Siani, A.C., Ramos, M.F.S.,
671 Danelli, M. das G.M., Souto-Padron, T.C., Pinto-da-Silva, L.H., 2018. The in vitro
672 antileishmanial activity of essential oil from *Aloysia gratissima* and guaiol, its major
673 sesquiterpene against *Leishmania amazonensis*. Parasitology 145, 1219–1227.
674 https://doi.org/10.1017/S0031182017002335

675 Ghasemi, E., Ghaffarifar, F., Dalimi, A., Sadraei, J., 2019. In-vitro and in-vivo
676 antileishmanial activity of a compound derived of platinum, oxaliplatin, against
677 *Leishmania major*. Iran. J. Pharm. Res. 18, 2028–2041.
678 https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.15364.13046

679 Jakhar, R., Sharma, C., Paul, S., Kang, S.C., 2018. Immunosuppressive potential of
680 astemizole against LPS activated T cell proliferation and cytokine secretion in RAW
681 macrophages, zebrafish larvae and mouse splenocytes by modulating MAPK signaling
682 pathway. Int. Immunopharmacol. 65, 268–278.
683 https://doi.org/10.1016/j.intimp.2018.10.014

684 Hendrickx, S., Caljon, G., Maes, L., 2019. Need for sustainable approaches in antileishmanial
685 drug discovery. Parasitol. Res. 118, 2743–2752. https://doi.org/10.1007/s00436-019-
686 06443-2

687 Horta, M.F., Mendes, B.P., Roma, E.H., Noronha, F.S.M., MacDo, J.P., Oliveira, L.S.,
688 Duarte, M.M., Vieira, L.Q., 2012. Reactive oxygen species and nitric oxide in cutaneous
689 leishmaniasis. J. Parasitol. Res. 2012. https://doi.org/10.1155/2012/203818

690 Kauffmann, C., Ethur, E.M., Arossi, K., Hoehne, L., de Freitas, E.M., Machado, G.M. de C.,
691 Cavalheiro, M.M. do C., Flach, A., da Costa, L.A.M.A., Gnoatto, S.C.B., 2017.
692 Chemical composition and evaluation preliminary of antileishmanial activity in vitro of
693 essential oil from leaves of *Eugenia pitanga*, a native species of southern of Brazil. J.
694 Essent. Oil-Bearing Plants 20, 559–569.
695 https://doi.org/10.1080/0972060X.2017.1281767

696 Kauffmann, C., Giacomin, A.C., Arossi, K., Pacheco, L.A., Hoehne, L., de Freitas, E.M.,
697 Machado, G.M. de C., Cavalheiro, M.M. do C., Gnoatto, S.C.B., Ethur, E.M., 2019.
698 Antileishmanial in vitro activity of essential oil from *Myrciaria plinioides*, a native
699 species from Southern Brazil. Brazilian J. Pharm. Sci. 55, 1–8.
700 https://doi.org/10.1590/s2175-97902019000217584

Machín, L., Nápoles, R., Gille, L., Monzote, L., 2021. *Leishmania amazonensis* response to artemisinin and derivatives. Parasitol. Int. https://doi.org/10.1016/j.parint.2020.102218

Mahmoudvand, H., Tavakoli, R., Sharififar, F., Minaie, K., Ezatpour, B., Jahanbakhsh, S., Sharifi, I., 2015. Leishmanicidal and cytotoxic activities of *Nigella sativa* and its active principle, thymoquinone. Pharm. Biol. 53, 1052–1057. https://doi.org/10.3109/13880209.2014.957784

Maquiaveli, C. do C., Rochetti, A.L., Fukumasu, H., Vieira, P.C., da Silva, E.R., 2017. Antileishmanial activity of verbascoside: Selective arginase inhibition of intracellular amastigotes of Leishmania (Leishmania) amazonensis with resistance induced by LPS plus IFN-γ. Biochem. Pharmacol. 127, 28–33. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.018

Marques, S.A., Merlotto, M.R., Ramos, P.M., Alencar, M.E., 2019. Antimonial in a patient with chronic renal failure, 94, 355–357.

Noleto Dias, C., Nunes, T.A. de L., Sousa, J.M.S. de, Costa, L.H., Rodrigues, R.R.L., Araújo, A.J., Marinho Filho, J.D.B., da Silva, M.V., Oliveira, M.R., Carvalho, F.A. de A., Rodrigues, K.A. da F., 2020. Methyl gallate: Selective antileishmanial activity correlates with host-cell directed effects. Chem. Biol. Interact. https://doi.org/10.1016/j.cbi.2020.109026

Nwaka, S., Hudson, A., 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. Nat. Rev. Drug Discov. 5, 941–955. https://doi.org/10.1038/nrd2144

Rodrigues, K.A.D.F., Amorim, L.V., Dias, C.N., Moraes, D.F.C., Carneiro, S.M.P., Carvalho, F.A.D.A., 2015a. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent α-pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. J. Ethnopharmacol. 160, 32–40. https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.11.024

Rodrigues, K.A.D.F., Amorim, L.V., Oliveira, J.M.G. De, Dias, C.N., Moraes, D.F.C., Andrade, E.H.D.A., Maia, J.G.S., Carneiro, S.M.P., Carvalho, F.A.D.A., 2013. *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-leishmania agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action. Evidence-based Complement. Altern. Med. 2013. https://doi.org/10.1155/2013/279726

Rodrigues, K.A.D.F., Dias, C.N.D.S., Neris, P.L.D.N., Rocha, J.D.C., Scotti, M.T., Scotti, L., Mascarenhas, S.R., Veras, R.C., Medeiros, I.A. De, Keesen, T.D.S.L., Oliveira, T.B. De, Lima, M.D.C.A. De, Balliano, T.L., Aquino, T.M. De, Moura, R.O. De, Mendoncą Junior, F.J.B., Oliveira, M.R. De, 2015b. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation in vitro. Eur. J. Med. Chem. 106, 1–14. https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.10.011

Rodrigues, R.R.L., Nunes, T.A.L., de Araújo, A.R., Marinho Filho, J.D.B., da Silva, M.V., Carvalho, F.A. de A., Pessoa, O.D.L., Freitas, H.P.S., Rodrigues, K.A. da F., Araújo, A.J., 2020. Antileishmanial activity of cordiaquinone E towards *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*. Int. Immunopharmacol. https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107124

740 Santos, A., Sarmento-Ribeiro, A.B., Pedroso De Lima, M.C., Simões, S., Moreira, J.N., 2008.
741 Simultaneous evaluation of viability and Bcl-2 in small-cell lung cancer. Cytom. Part A
742 73, 1165–1172. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20634

743 Schiessel, D.L., Yamazaki, R.K., Kryczyk, M., Coelho, I., Yamaguchi, A.A., Pequito, D.C.T.,
744 Brito, G.A.P., Borghetti, G., Fernandes, L.C., 2015. α-Linolenic fatty acid
745 supplementation decreases tumor growth and cachexia parameters in walker 256 tumor-
746 bearing rats. Nutr. Cancer 67, 839–846. https://doi.org/10.1080/01635581.2015.1043021

747 Silva, A.R.S.T., Scher, R., Santos, F. V., Ferreira, S.R., Cavalcanti, S.C.H., Correa, C.B.,
748 Bueno, L.L., Alves, R.J., Souza, D.P., Fujiwara, R.T., Dolabella, S.S., 2017.
749 Leishmanicidal activity and structure-activity relationships of essential oil constituents.
750 Molecules 22. https://doi.org/10.3390/molecules22050815

751 Tavares, J., Ouaissi, A., Lin, P.K.T., Tomás, A., Cordeiro-da-Silva, A., 2005. Differential
752 effects of polyamine derivative compounds against Leishmania infantum promastigotes
753 and axenic amastigotes. Int. J. Parasitol. 35, 637–646.
754 https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.01.008

755 Terreros, M.J.S., de Luna, L.A.V., Giorgio, S., 2019. Evaluation of antileishmanial drugs
756 activities in an ex vivo model of leishmaniasis. Parasitol. Int. 71, 163-166.
757 https://doi.org/10.1016/jprint.2019.04.011

758 Wang, Y., Li, J., Guo, J., Wang, Q., Zhu, S., Gao, S., Yang, C., Wei, M., Pan, X., Zhu, W.,
759 Ding, D., Gao, R., Zhang, W., Wang, J., Zang, L., 2017. Cytotoxic and antitumor effects
760 of curzerene from *Curcuma longa*. Planta Med. 83, 23–29. https://doi.org/10.1055/s-
761 0042-107083

762

EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

ISSN: 0014-2999

DESCRIPTION

The *European Journal of Pharmacology* publishes research papers covering all aspects of **experimental pharmacology** with focus on the mechanism of action of **structurally identified compounds** affecting **biological systems**.

The scope includes: **Behavioural pharmacology Neuropharmacology** and **analgesia Cardiovascular pharmacology Pulmonary**, **gastrointestinal** and **urogenital pharmacology Endocrine pharmacology Immunopharmacology** and **inflammation Molecular** and **cellular pharmacology Regenerative pharmacology Biologicals** and **biotherapeutics Translational pharmacology Nutriceutical pharmacology**

The journal publishes full-length papers and reviews.

The table of contents for this journal is now available pre-publication, via e-mail, as part of the free ContentsDirect service from Elsevier. Please send an e-mail message to cdhelp@elsevier.co.uk for further information about this service.

Benefits to authors
We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our author services .

Please see our Guide for Authors for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our Support Center

backbanner.gifScienceDirect Backfiles

AUDIENCE

Pharmacologists, Toxicologists, Neuroscientists, Molecular Biologists, Medicinal Chemists

IMPACT FACTOR

2019: 3.263 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2020

ABSTRACTING AND INDEXING

BIOSIS Citation Index
Chemical Abstracts
Current Contents - Life Sciences
Embase
Elsevier BIOBASE
PubMed/Medline
Unlisted Drugs
Pascal Francis
Reference Update
Scopus

EDITORIAL BOARD

Founded in 1967

Founding Editors

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

The *European Journal of Pharmacology* publishes full-length papers on the mechanisms of action of chemical substances affecting biological systems. The journal also considers short reviews (not exceeding 12 pages in print) intended to debate recent advances in rapidly developing fields that are within its scope.

Full-length papers are grouped under the following headings: Behavioral pharmacology, Neuropharmacology and analgesia, Cardiovascular pharmacology, Pulmonary, gastrointestinal and urogenital pharmacology, Endocrine pharmacology, Immunopharmacology and inflammation, and Molecular and cellular pharmacology.

Manuscripts submitted to the journal are accepted on the understanding that they are subject to editorial review.

Types of paper

The journal publishes the following article types:
1. Research Paper
2. Review Article

Please note that the journal no longer accepts submission of Rapid Communications and Short Communications.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:
- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:
Manuscript:
- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
Supplemental files (where applicable)

Further considerations
- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Declaration of interest

All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential competing interests include employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. Authors must disclose any interests in two places: 1. A summary declaration of interest statement in the title page file (if double-blind) or the manuscript file (if single-blind). If there are no interests to declare then please state this: 'Declarations of interest: none'. This summary statement will be ultimately published if the article is accepted. 2. Detailed disclosures as part of a separate Declaration of Interest form, which forms part of the journal's official records. It is important for potential interests to be declared in both places and that the information matches. More information.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract, a published lecture or academic thesis, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service Crossref Similarity Check.

Preprints

Please note that preprints can be shared anywhere at any time, in line with Elsevier's sharing policy. Sharing your preprints e.g. on a preprint server will not count as prior publication (see 'Multiple, redundant or concurrent publication' for more information).

Use of inclusive language

Inclusive language acknowledges diversity, conveys respect to all people, is sensitive to differences, and promotes equal opportunities. Content should make no assumptions about the beliefs or commitments of any reader; contain nothing which might imply that one individual is superior to another on the grounds of age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition; and use inclusive language throughout. Authors should ensure that writing is free from bias, stereotypes, slang, reference to dominant culture and/or cultural assumptions. We advise to seek gender neutrality by using plural nouns ("clinicians, patients/clients") as default/wherever possible to avoid using "he, she," or "he/she." We recommend avoiding the use of descriptors that refer to personal attributes such as age, gender, race, ethnicity, culture, sexual orientation, disability or health condition unless they are relevant and valid. These guidelines are meant as a point of reference to help identify appropriate language but are by no means exhaustive or definitive.

Author contributions

For transparency, we encourage authors to submit an author statement file outlining their individual contributions to the paper using the relevant CRediT roles: Conceptualization; Data curation; Formal analysis; Funding acquisition; Investigation; Methodology; Project administration; Resources; Software; Supervision; Validation; Visualization; Roles/Writing - original draft; Writing - review & editing. Authorship statements should be formatted with the names of authors first and CRediT role(s) following. More details and an example

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service
This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For gold open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of gold open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights
As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing
Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Open access

Please visit our Open Access page for more information.

Elsevier Researcher Academy
Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)
Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's Author Services.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Reviewers
Please submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of at least three potential reviewers. Reviewers who do not have an institutional e-mail address will only be considered if their affiliations are given and can be verified. Preferably international reviewers should be nominated, and their areas of expertise must be stated clearly. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Additional information
Please make sure to adhere to the following word limits:

Abstract: max. 250 words
Introduction: max. 500 words
Discussion: max. 1500 words

PREPARATION

Peer review
This journal operates a single anonymized review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. Editors are not involved in decisions about papers which they have written themselves or have been written by family members or colleagues or which relate to products or services in which the editor has an interest. Any such submission is subject to all of the journal's usual procedures, with peer review handled independently of the relevant editor and their research groups. More information on types of peer review.

Use of word processing software
It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.
To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure
Subdivision - numbered sections
Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction
State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Please make sure to limit the length of this paragraph to max. 500 words.

Material and methods
Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results
Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. Avoid extensive citations and discussion of published literature. Please make sure to limit the length of this paragraph to max. 1500 words.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion section.

Essential title page information

• ***Title.*** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

• ***Author names and affiliations.*** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

• ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

• ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Highlights

Highlights are optional yet highly encouraged for this journal, as they increase the discoverability of your article via search engines. They consist of a short collection of bullet points that capture the novel results of your research as well as new methods that were used during the study (if any). Please have a look at the examples here: example Highlights.

Highlights should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A Graphical abstract is optional for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more, but should be readable on screen at a size of 200 × 500 pixels (at 96 dpi this corresponds to 5 × 13 cm). Bear in mind readability after reduction, especially if using one of the figures from the article itself. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. See https://www.elsevier.com/graphicalabstracts for examples.

Ethics statement animal experimentation

Authors are required to add a statement of ethical approval for animal experimentation that will be recognised worldwide. Indicate the nature of the ethical review permissions, and national or institutional guidelines for the care and use of animals, that cover the research. The statement must comprise the application approval number(s) and name of the approving organisation.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and nomenclature, and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, "and", "of"). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Electrophoretic gels and blots

Gel and blot images of non-manipulated, non-cut gels or blots are preferred. Molecular weight of relevant bands should be indicated in the image. If re-ordering of the sequence of the samples is necessary, authors are encouraged to rerun the samples on a new gel/blot. If irrelevant parts of the gel image (such as blank lanes or lanes with molecular weight markers) are deleted or splicing of gel lanes is needed (because a rerun is not possible), this should be explicitly described in the figure legend. Authors should add contrasting lines to the image to show where sections have been spliced and joined. In cropped images important bands should be retained and in cropped blots at least six band widths should be visible above and below the band of interest. It is not allowed to combine images from different experiments into a new single image.

It is discouraged to perform quantitative comparisons between samples on different gels or blots. If this is unavoidable, the authors should state in the figure legend that samples derive from the same experiment and that gels/blots were processed in parallel. Quantitative analysis should be normalized to loading controls (e.g. GAPDH, actin, non-phosphorylated protein). Loading controls should be analyzed on the same blot.

Authors should retain their unprocessed gel/blot images, as editors may request them to aid in manuscript evaluation.

Abbreviations

Abbreviations are a hindrance for the reader. Use as few abbreviations as possible and write out names of compounds, receptors, etc., in full throughout the text of the manuscript, with the exceptions given HERE.

Unnecessary abbreviations. Unnecessary abbreviations such as AP, TEP, TFT, CER, nAc and LTFSE (for afterpotential, transepithelial potential, Tail-flick test, cold-exposed rats, nucleus accumbens and sympatho-excitatory lateral tegmental field) are **not** acceptable.
Receptor abbreviations. Receptor abbreviations such as *β*AR, mAChR, BZR for *β*-adrenoceptor, muscarinic receptor, benzodiazepine receptor, respectively, should **not** be used. For receptors avoid the abbreviation "R". With receptor subtypes mention the full receptor name throughout the manuscript e.g., adenosine A_1 receptor, dopamine D_2 receptor, melanocortin MC_3 receptor, endothelin ET_A receptor.
Generic names. Generic names should **not** be abbreviated. For example, AMP, HAL, HIST, RAMH, TAM, SST, for amphetamine, haloperidol, histamine, (R)-a -methylhistamine, tamoxifen, somatostatin, are not accepted. Abbreviations such as (e.g., NA, DA, ACh, ET for noradrenaline, dopamine, acetylcholine, endothelin, should **not** be used.
Abbreviations which have come to replace the full term. Abbreviations which have come to replace the full term (e.g., GABA, DOPA, EDRF, 5HT, for γ-aminobutyric acid, 3,4-dihydroxyphenylalanine, endothelium-derived relaxing factor, 5-hydroxytryptamine) may be used, provided the term is spelled out in the abstract and in the body of the manuscript the first time the abbreviation is used.
Unwieldy chemical names. Unwieldy chemical names may be abbreviated. For example, 8- OH-DPAT, DOI, DTG, BAPTA, for 8-hydroxy-2-(di-*n*-propylamino)tetralin, 1-(2,5-dimethoxy-4-iodophenyl)-aminopropane, 1,3-di(2-tolyl)-guanidine, 1,2-bis(*o*-aminophenoxy)ethane-*N,N,N′,N′*-tetraacetic acid, are acceptable; however, the full chemical name should be given once in the abstract and in the body of the manuscript, followed in both cases by the abbreviation.
Code names. Code names may be used, but the full chemical name should be given in the abstract and in the text.
Authors not conforming to these demands will have their manuscripts returned for correction, with delayed publication as the result.

Acknowledgements
Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources
List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

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

Nomenclature and Units

Only generic and chemical names of drugs should be used, although a proprietary equivalent may be indicated once, in parentheses. The nomenclature of chemical substances should be consistent, clear and unambiguous, and should conform to the usage of the American Chemical Society and the convention recommended by the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC, http://www.iupac.org/general/FAQs/ns.html) When in doubt, writers should consult the indexes of Chemical Abstracts; the various reports and pamphlets of the American Chemical Society Committee on Nomenclature, Spelling and Pronunciation; the recommendations of the IUBMB (http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb) When drugs which are mixtures of stereoisomers are used, the fact that they have a composite nature and the implication of this for interpretation of the data and drawing of conclusions should be made clear. The use of the appropriate prefix is essential. Use of the generic name alone without a prefix would be taken to refer to agents with no stereoisomers. The nomenclature of receptors and their subtypes and of ion channels should conform to NCIUPHAR (http://www.iuphar.org/nciuphar.html) he trivial name of enzymes may be used in the text, but the systematic name and classification number according to Enzyme Nomenclature of the NC-IUBMB (http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/), rev. edn. (Academic Press, New York, NY, 1984) should be quoted the first time an enzyme is mentioned.

Math formulae
Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes
Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork
General points
- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.

• Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
• Submit each illustration as a separate file.
• Ensure that color images are accessible to all, including those with impaired color vision.

A detailed guide on electronic artwork is available.
You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.
Formats
If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.
Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.
TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.
TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.
TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.
Please do not:
• Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
• Supply files that are too low in resolution;
• Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork
Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF) or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) in addition to color reproduction in print. Further information on the preparation of electronic artwork.

The use of color for graphics or tables is strongly discouraged (exceptions are made for invited reviews).

Figure captions
Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables
Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References
Citation in text
Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links
Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is highly encouraged.

A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research, https://doi.org/10.1029/2001JB000884. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references
As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references
This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue
Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software
Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley. Using citation plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide. If you use reference management software, please ensure that you remove all field codes before submitting the electronic manuscript. More information on how to remove field codes from different reference management software.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:
http://open.mendeley.com/use-citation-style/european-journal-of-pharmacology
When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting
There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style
Text: All citations in the text should refer to:
1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;
2. *Two authors:* both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors:* first author's name followed by 'et al.' and the year of publication.
Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references can be listed either first alphabetically, then chronologically, or vice versa.
Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999)…. Or, as demonstrated (Jones, 1999; Allan, 2000)… Kramer et al. (2010) have recently shown …'
List: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.
Examples:
Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. J. Sci. Commun. 163, 51–59. https://doi.org/10.1016/j.Sc.2010.00372.
Reference to a journal publication with an article number:
Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2018. The art of writing a scientific article. Heliyon. 19, e00205. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2018.e00205.
Reference to a book:
Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. The Elements of Style, fourth ed. Longman, New York.
Reference to a chapter in an edited book:
Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith , R.Z. (Eds.), Introduction to the Electronic Age. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.
Reference to a website:
Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/ (accessed 13 March 2003).
Reference to a dataset:
[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1.

Journal abbreviations source
Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Data visualization

Include interactive data visualizations in your publication and let your readers interact and engage more closely with your research. Follow the instructions here to find out about available data visualization options and how to include them with your article.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

Research data

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking
If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data
This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. During the submission process, after uploading your manuscript, you will have the opportunity to upload your relevant datasets directly to *Mendeley Data*. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief
You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into a data article published in *Data in Brief*. A data article is a new kind of article that ensures that your data are actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and made publicly available to all upon publication (watch this video describing the benefits of publishing your data in *Data in Brief*). You are encouraged to submit your data article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed, published open access and linked to your research article on ScienceDirect. Please note an open access fee is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your *Data in Brief* data article.

Data statement
To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction
To ensure a fast publication process of the article, we kindly ask authors to provide us with their proof corrections within two days. Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.
If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Author Services. Corresponding authors who have published their article gold open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.
You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.