

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA  
BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**LUISA TRINDADE DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*TRITRICHOMONAS FOETUS* DE  
CHALCONAS SINTÉTICAS**

**PORTO ALEGRE  
2024/1**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*TRITRICHOMONAS FOETUS* DE  
CHALCONAS SINTÉTICAS**

Autor: Luisa Trindade dos Santos  
Trabalho apresentado à Faculdade de Veterinária como  
requisito parcial para a obtenção da graduação em  
Medicina Veterinária  
Orientadora: Monique Tomazele Rovani  
Coorientadora: Tiana Tasca

**PORTO ALEGRE  
2024/1**

## CIP - Catalogação na Publicação

dos Santos, Luisa Trindade  
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-TRITRICHOMONAS FOETUS  
DE CHALCONAS SINTÉTICAS / Luisa Trindade dos Santos.  
-- 2024.  
30 f.  
Orientadora: Monique Tomazele Rovani.

Coorientadora: Tiana Tasca.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade  
de Veterinária, Curso de Medicina Veterinária, Porto  
Alegre, BR-RS, 2024.

1. Introdução. 2. Artigo científico . 3.  
Considerações finais. 4. Referências. I. Rovani,  
Monique Tomazele, orient. II. Tasca, Tiana, coorient.  
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

**LUISA TRINDADE DOS SANTOS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*TRITRICHOMONAS FOETUS* DE  
CHALCONAS SINTÉTICAS**

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

APROVADO POR:

---

Prof. Dr. Monique Tomazele Rovani  
Orientador e Presidente da Comissão

---

Prof. Dr. Fernando Caetano de Oliveira  
Membro da Comissão

---

Prof. Dr. Verônica La Cruz Bueno  
Membro da Comissão

Dedico este trabalho aos meus pais, que  
sempre me apoiaram e me encorajaram a  
concluir meus estudos.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente aos meus pais, Anelise e Paulo, pois foram excepcionais na minha criação, sempre me apoiando imensamente e me incentivando a chegar até aqui. Agradeço também ao meu padrasto Silvio, por me apoiar e me tratar como uma filha, agradeço ao meu irmão João Paulo, minha tia Lisiane e minha madrinha Viviane. O apoio de todos foi crucial para meu desenvolvimento como pessoa e como profissional.

Agradeço a UFRGS, a Faculdade de Medicina Veterinária e aos professores do curso por terem me proporcionado um ensino de qualidade e aprendizados que levarei para minha vida profissional.

Agradeço às minhas amigas da faculdade, em especial Ana Laura, minha parceira e dupla inseparável desde o início dessa jornada, obrigada por compartilhar as experiências boas e ruins comigo, tornaste meu caminho muito mais leve e feliz, te levarei para toda vida.

Agradeço aos meus colegas do GPTrico por me apoiarem e me acolherem com tanto carinho e paciência, gratidão Fernanda, Giulia, Saulo e Magno por todos os ensinamentos.

Agradeço à minha coorientadora Tiana, que me permitiu fazer parte de algo grandioso, agradeço pela paciência, ensinamentos e por me guiar nessa jornada acadêmica, tens toda minha admiração e respeito, foi graças a ti que eu conheci o amor pela pesquisa, serei eternamente grata.

Agradeço em especial à minha irmã de outras vidas, Giulia, por estar ao meu lado há quase 20 anos e por me apoiar em cada passo que dou, tuas dicas, conselhos e ensinamentos foram indispensáveis para que eu pudesse concluir meu tcc, gratidão por sempre encontrar tempo para mim, mesmo nos teus dias mais corridos e caóticos.

Agradeço à minha orientadora Monique, por aceitar me ajudar a conduzir esse trabalho incrível e disponibilizar seu tempo e conhecimento para me ajudar a finalizar essa etapa.

Agradeço à Deisiane, por me ensinar tanto e pela paciência e acolhimento, obrigada por tornar a rotina muito mais leve e divertida.

Agradeço aos meus animais Diana, Aladdin, Jasmine, Preta, Pitucha e Toruga, por serem meu apoio emocional nos momentos em que eu mais preciso, obrigada por transformarem a minha vida em algo doce e gentil.

## RESUMO

O parasito *Tritrichomonas foetus* é o agente causador da tricomoníase em bovinos e gatos domésticos. Em bovinos, a transmissão é venérea e há manifestações clínicas no trato reprodutivo, como ciclos estrais irregulares, vaginite, cervicite e endometrite, causando prejuízo econômico importante para o produtor. Não há tratamento efetivo para bovinos e o controle se dá através do descarte de touros infectados, descarte de fêmeas problema e utilização da inseminação artificial. Já em gatos domésticos, a transmissão se dá por via fecal-oral e há o acometimento do trato gastrointestinal, ocasionando diarreia crônica. O tratamento é feito com administração de um derivado do nitroimidazol, o ronidazol; entretanto, esse medicamento não é eficaz para todos os gatos acometidos, além de possuir margem de segurança estreita e casos de resistência relatados na literatura. Neste contexto, é essencial a busca por novas opções terapêuticas para o tratamento da tricomoníase bovina e felina. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-*Tritrichomonas foetus* de chalconas sintéticas, moléculas que apresentam atividades biológicas, incluindo antiparasitárias. Utilizando placas de 96 poços, foi realizado o *screening* dos compostos na concentração de 100 µM em contato com *T. foetus* ajustados na densidade de  $2,0 \times 10^7$  trofozoítos/mL. As chalconas sintéticas Li-43 e Li-83 apresentaram maior atividade de inibição da viabilidade de trofozoítos de *T. foetus* e potentes valores de IC<sub>50</sub> (2,2 e 24,6 µM), demonstrando potencial na busca por novos fármacos contra a tricomoníase bovina e felina.

Palavras-chave: *Tritrichomonas foetus*; Chalconas; Antiparasitária

## **ABSTRACT**

*The parasite *Tritrichomonas foetus* is the causative agent of trichomoniasis in cattle and domestic cats. In cattle, transmission is venereal and there are clinical manifestations in the reproductive tract causing significant economic loss to the producer. There is no effective treatment for cattle, and it is controlled through the culling of old bulls and infertile cows, and the use of artificial insemination. In domestic cats, transmission occurs through the fecal-oral route and the gastrointestinal tract is affected. Treatment is done with the administration of a nitroimidazole derivative, ronidazole; however, this drug is not effective for all affected cats, in addition to having a narrow safety margin and cases of resistance reported in the literature. In this context, it is essential to search for new therapeutic options for the treatment of bovine and feline trichomoniasis. The aim of this study was to evaluate the anti-*Tritrichomonas foetus* activity of synthetic chalcones, molecules that have several biological activities, including antiparasitic, was evaluated. Using 96-well plates, the screening of the compounds at a concentration of 100  $\mu\text{M}$  in contact with *T. foetus* was performed adjusted at the density of  $2.0 \times 10^5$  trophozoites/mL. The synthetic chalcones Li-43 and Li-83 showed higher activity to inhibit the viability of trophozoites of *T. foetus* and powerful  $\text{IC}_{50}$  values (2.2 and 24.6  $\mu\text{M}$ ), proving potential in the search for new drugs against bovine and feline trichomoniasis.*

*Keywords: *Tritrichomonas foetus*; Chalcones; Antiparasitic*



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Atividade anti- <i>T. foetus</i> de chalconas sintéticas .....	19
Figura 2 - Diluição seriada do composto Li-43 .....	20
Figura 3 - Diluição seriada do composto Li-83 .....	20
Figura 4 - Imagens de microscópio óptico de trofozoítos de <i>T. foetus</i> no experimento de diluição serial da chalcona Li-83 .....	22

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>T. foetus</i>	<i>Tritrichomonas foetus</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	12
2	ARTIGO CIENTÍFICO .....	15
3	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	28
	REFERÊNCIAS .....	29

## 1 INTRODUÇÃO

O parasito *Tritrichomonas foetus* (*T. foetus*) é um protozoário do filo Parabasalia, ordem Trichomonadida e família Trichomonadidae, possuindo como uma de suas principais características a anaerobiose (Bugerolle; Lee, 2000). Os trofozoítos são pleomórficos, embora geralmente possuam formato piriforme, e apresentam três flagelos anteriores e um flagelo posterior, além de uma membrana ondulante. Esses aspectos contribuem para a diferenciação e identificação do parasito em termos diagnósticos (Rae; Crews, 2006). O protozoário é o agente causador da tricomoníase em bovinos e felinos domésticos (Bastos, 2019). No entanto, não há relatos de transmissão entre bovinos e felinos domésticos (Bastos *et al*, 2019).

Nos bovinos, a doença é considerada endêmica em propriedades que utilizam a monta natural como método de reprodução (Ondrak, 2016) e afeta o trato reprodutivo desses animais. Os machos costumam ser assintomáticos e o parasito se localiza nas secreções do revestimento epitelial do pênis, prepúcio e uretra distal. Segundo o Centro de Pesquisa e Desenvolvimento de Sanidade Animal, 2009, o parasito foi descrito no Brasil pela primeira vez no ano de 1948 e estudos apontaram uma prevalência da doença de 3,7% no país (Filho *et al*, 2018 *apud* Dąbrowska, 2019, p. 2).

Apesar de não apresentarem sinais clínicos, os machos infectados se tornam portadores crônicos da doença e passam a ser uma importante fonte de infecção para as fêmeas, pois a tricomoníase é transmitida de forma venérea nessa espécie (Rae; Crews, 2006). Touros mais velhos apresentam maior prevalência da doença, pois possuem maior quantidade de criptas (invaginações microscópicas do pênis e prepúcio), local onde o *T. foetus* se localiza (Ondrak, 2016). Em fêmeas, *T. foetus* se localiza preferencialmente no colo do útero e causa principalmente morte embrionária precoce (Yule; Skirrow; BonDurant, 1989), além de poder ocasionar piometra, cervicite e endometrite (BonDurant, 2005). Geralmente, os sinais clínicos nas fêmeas desaparecem após meses de repouso sexual, porém é possível que algumas vacas permaneçam inférteis (Schroeder *et al*, 2023). O diagnóstico pode ser realizado através da coleta de material do trato genital de machos e fêmeas e visualização do parasito em microscópio óptico e posterior incubação e cultivo das amostras ou realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), além da observação dos sinais clínicos e histórico do lote (Filho *et al*, 2018).

Nos animais de produção, o impacto econômico causado pela doença é significativo e traz perdas para os proprietários de fazendas, pois ocorre redução das taxas de parto e aumento

dos custos relacionados ao descarte e substituição de bovinos infectados (Schroeder *et al*, 2023). Atualmente, a principal forma de controle e prevenção da tricomoníase em bovinos é a substituição da monta natural pela inseminação artificial, considerando que o parasito não sobrevive no sêmen (Jin; Du; Yao, 2020). Além disso, é recomendado o descarte de machos infectados (Calvani *et al*, 2021).

Em gatos domésticos, o parasito foi descrito pela primeira vez no ano de 1996 e desde então a doença acomete a espécie mundialmente (Dąbrowska *et al*, 2019), apresentando alta prevalência, embora muitos casos sejam subdiagnosticados (Rush; Slapeta, 2021). A enfermidade causa sinais de trato gastrointestinal e a transmissão ocorre por via fecal-oral. O protozoário sobrevive nas fezes por sete dias em temperatura ambiente, ocasionando altas chances de contágio, principalmente em locais com grande população de felinos convivendo em conjunto e em gatos com um ano de idade ou menos (Bastos; Almeida; Brener, 2019). Os animais acometidos apresentam diarreia crônica caracterizada principalmente pelo aumento da frequência de defecação, presença de muco nas fezes, hematoquezia e tenesmo (Crisi *et al*, 2021).

O diagnóstico é realizado a partir da análise das manifestações clínicas e histórico do animal acometido em conjunto com esfregaço fecal direto diluído com solução salina, cultura por inoculação ou PCR. A obtenção de fezes para realização dos exames pode ser feita de forma manual com a ajuda de alças para a coleta ou através da introdução de uma sonda uretral no reto do paciente e colocação de solução salina para realização de lavagem (Yao; Köster, 2015).

Não há tratamento com alta eficácia disponível atualmente. Estratégias utilizando antimicrobianos foram testadas *in vitro* e *in vivo*, porém não houve resposta positiva. Alguns pacientes apresentam melhora temporária, ocorrendo recidiva posteriormente. A conduta terapêutica mais aceita inclui a utilização do fármaco ronidazol, porém existem relatos de resistência descritos na literatura e efeitos colaterais com manifestações de sistema nervoso (Manning, 2010), incluindo letargia, ataxia, tremores de extremidade, tremor facial, agitação e hiperestesia, sendo estes sinais clínicos que coincidem com efeitos causados por administração de altas doses de metronidazol (LeVine *et al*, 2011). Além disso, o ronidazol não foi aprovado para o uso na espécie (Hinney *et al*, 2019), embora as farmácias manipulem quando prescrito (LeVine *et al*, 2011). A prevenção inclui minimizar fatores estressantes aos animais, evitar populações densas de gatos e desinfecção do ambiente, incluindo liteiras, camas e fômites (Manning, 2010).

Devido ao crescente reconhecimento de resistência medicamentosa e a falta de opções terapêuticas, o objetivo dessa pesquisa é encontrar um composto potente e seguro que possa vir

a ser um fármaco promissor no tratamento de infecções causadas por *Tritrichomonas foetus* nos animais, testando a atividade de chalconas sintéticas contra o parasito e avaliando sua capacidade de controlar e eliminar a doença.

Chalconas são moléculas classificadas como cetonas aromáticas  $\alpha,\beta$ -insaturadas precursoras de flavonoides e isoflavonoides que possuem alto valor biológico. Ao longo das últimas décadas foram desenvolvidos análogos sintéticos que têm apresentado atividade antioxidante, anticâncer, antimicrobiana, anti-protozoário, antiúlcera, antiviral, anti-histaminica, anti-HIV e anti-inflamatória (Wangngae et al, 2021). O modo de ação desses compostos ainda não foi totalmente esclarecido (Pozzetti et al, 2022).

Estudos do nosso grupo de pesquisa avaliaram a ação de chalconas fenólicas sintéticas e obtiveram resultados promissores no combate à tricomoníase humana, a infecção sexualmente transmissível não viral mais comum no mundo causada pelo agente etiológico *Trichomonas vaginalis* (Trein et al, 2019; Oliveira et al, 2023).

## 2 ARTIGO CIENTÍFICO

Nesta seção será apresentado o artigo que será submetido à Revista Veterinary Parasitology.

### ***Anti-Tritrichomonas foetus activity of synthetic chalcones***

Luisa Trindade, Tiana Tasca, Monique Tomazele

Grupo de Pesquisa em Tricomonas, Faculdade de Farmácia e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves 9500, Porto Alegre 91501-970, Brazil

#### **Abstract**

*The parasite Tritrichomonas foetus is the causative agent of trichomoniasis in cattle and domestic cats. In cattle, transmission is venereal and there are clinical manifestations in the reproductive tract causing significant economic loss to the producer. There is no effective treatment for cattle, and it is controlled through the culling of old bulls and infertile cows, and the use of artificial insemination. In domestic cats, transmission occurs through the fecal-oral route and the gastrointestinal tract is affected. Treatment is done with the administration of a nitroimidazole derivative, ronidazole; however, this drug is not effective for all affected cats, in addition to having a narrow safety margin and cases of resistance reported in the literature. Therefore, it is essential to search for new therapeutic options. Therefore, the anti-Tritrichomonas foetus activity of synthetic compounds called chalcones, molecules that have several biological activities, including antiparasitic, was evaluated. The synthetic chalcones Li-43 and Li-83 showed greater activity in inhibiting trophozoites of T. foetus with IC<sub>50</sub> values 2.2 and 24.6 μM respectively and proved to be promising compounds in the search for new drugs against the disease.*

*Keywords: Tritrichomonas foetus; Chalcones; Antiparasitic*

## Introduction

*Tritrichomonas foetus* is a flagellated protozoan belonging to the phylum Parabasalia and is the etiological agent of trichomoniasis in cattle and domestic felines. In cattle, the parasite is located in the reproductive tract of the animals and the disease is transmitted venereally and represents an important cause of economic losses in affected properties (Tolbert; Gookin, 2016). Males are often chronic asymptomatic carriers (Rae; Crews, 2006), females may present early embryonic death, pyometra, cervicitis and endometritis (BonDurant, 2005). Generally, clinical signs in females disappear after months of sexual rest, however it is possible that some cows remain infertile (Schroeder et al, 2023). Control and prevention are achieved through the elimination of positive animals for the infection and implementation of artificial insemination as the only method of reproduction (Yule; Skirrow; BonDurant, 1989).

In domestic felines, the agent is found in the ileum, cecum and colon, and can cause enteritis. Transmission occurs via the fecal-oral route and the clinical picture may resolve within two years after the onset of infection, but these animals become an important source of infection during this period (Dąbrowska et al, 2015) and can remain infected for the rest of their lives (LeVine et al, 2011). The treatment described in the literature includes the use of Ronidazole, a nitroimidazole similar to metronidazole, but cases of resistance to the drug have been documented and possible side effects include lethargy, loss of appetite, ataxia and convulsions. Furthermore, the Food and Drug Administration (FDA, USA) has banned the use of the drug (Gookin; Hanrahan; Levy, 2017), although pharmacies continue to compound when prescribed (LeVine et al, 2011). Due to the increase in the number of cases of drug resistance described and the lack of therapeutic options, it is necessary to find a potent and safe compound that could become a promising drug in the treatment of infections caused by *Tritrichomonas foetus* in animals.



Chalcones are molecules classified as  $\alpha,\beta$ -unsaturated aromatic ketones and there are several naturally occurring ones reported in the literature (Jasim et al, 2021). Over the last few decades, synthetic analogues have been developed that have shown antioxidant, anticancer, antimicrobial, antiprotozoal, antiulcer, antiviral, antihistamine, anti-HIV and anti-inflammatory activity (Wangngae et al, 2021). As a result, many chalcones and their synthetic analogues have been the subject of studies and have demonstrated satisfactory results in the search for new drugs that can be used as therapeutic approaches for various infections (Leal et al, 2021). In this sense, this research aims to evaluate the activity of synthetic chalcones against the parasite *Tritrichomonas foetus* and evaluate their ability to control and eliminate the disease.

## **Material and Methods**

### **Synthetic chalcones**

The synthesis of chalcones tested in this study was conducted by Prof. Dr. Luis Octávio Regasini's research group (Laboratory of Antibiotics and Chemotherapeutics, Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), São Paulo State University), The chalcones were synthesized by the Claisen Schmidt condensation reaction (Trein et al, 2018), which is an aldol reaction involving the condensation of a benzaldehyde compound and a methyl-ethyl-ketone by catalysts (Zhuang et al, 2017). The 20 chalcones tested were: Li-36, T4-77, Li-34, Li-40, Li-41, Li-45, T4-4NO<sub>2</sub>, T4-4Br, Li-72, Li-33, Li-38, T3-4Br, Li-70C, Li-56, T3-2,4DiCl, Li-48, Li-73, Li-74, Li-43 e Li-83.

### ***In vitro* culture of *T. foetus***

In this study, the *T. foetus* TFK isolate obtained by Dr. H. Guida (Embrapa, Rio de Janeiro, Brazil) from the urogenital tract of a bull was used. Trophozoites were cultured in TYM (trypticase-yeast extract-maltose) medium at pH 7.2 supplemented with 10% inactivated bovine serum. Incubation was performed in a 5% CO<sub>2</sub> incubator at 37°C.

### **Screening of anti-*T. foetus* activity of chalcone derivatives**

The screening of 20 chalcones was performed in 96-well microplates. Chalcone solutions in DMSO (100%) were tested at a final concentration of 100 µM (and final concentration of vehicle, DMSO 0.6%) and trophozoites were added at a final density of  $2.0 \times 10^7$ /mL and maintained at 37 °C for 24 h in 5% CO<sub>2</sub>. Two controls were performed: parasites only and vehicle control (DMSO 0.6%). Activity was determined by evaluating the motility and morphology of trophozoites compared to the vehicle control by counting with a hemocytometer using trypan blue exclusion dye (0.2%, v/v). Viability was determined as the percentage of viable trophozoites compared to the control. The compounds that showed the best activity were tested to determine the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>).

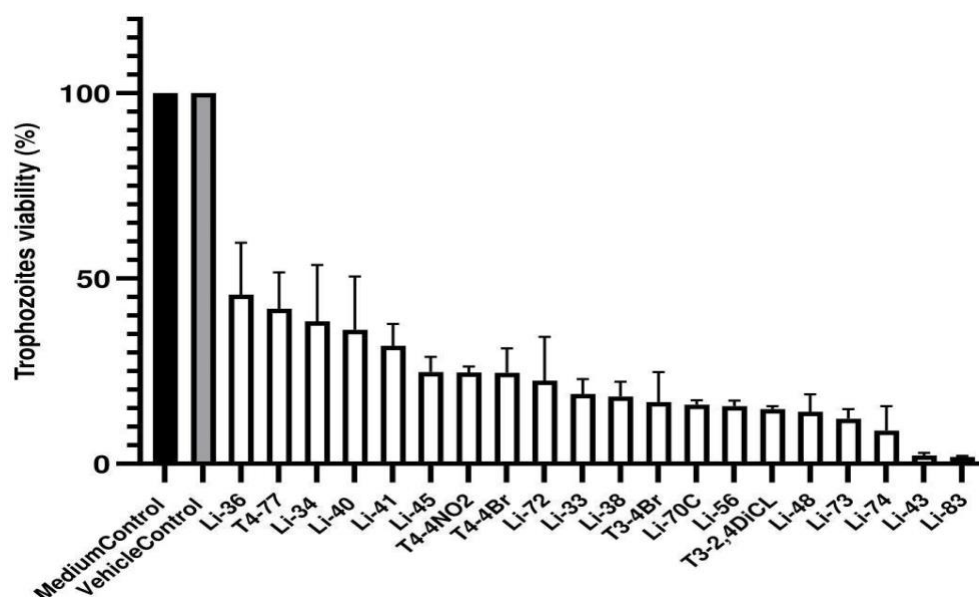
### **Determination of IC<sub>50</sub> values**

The most active chalcones in the screening assay were tested in serial dilution (concentrations ranging from 100 to 0.78 µM) to determine the IC<sub>50</sub> values. The results were evaluated using the GraphPad Prism software.

## Results

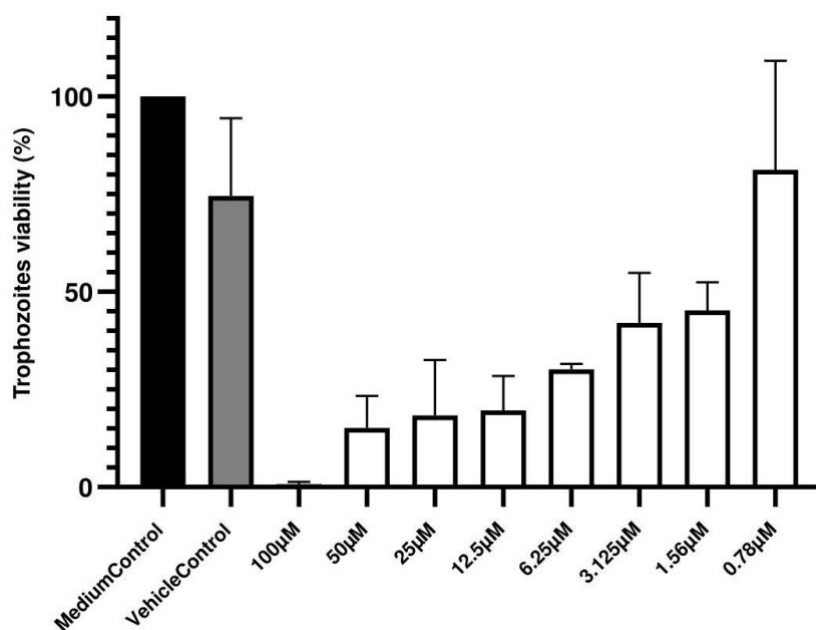
### Synthetic chalcones presented anti-*T. foetus* activity

Twenty synthetic chalcones were tested against *T. foetus* TFK isolate at a concentration of 100  $\mu$ M (Figure 1). The viability of *T. foetus* in contact with the compounds ranged from 45.63% to 1.84%. All compounds tested inhibited trophozoite viability to a moderate extent, except Li-43 and Li-83, which had inhibition greater than 90%, as can be seen in Figure 1.

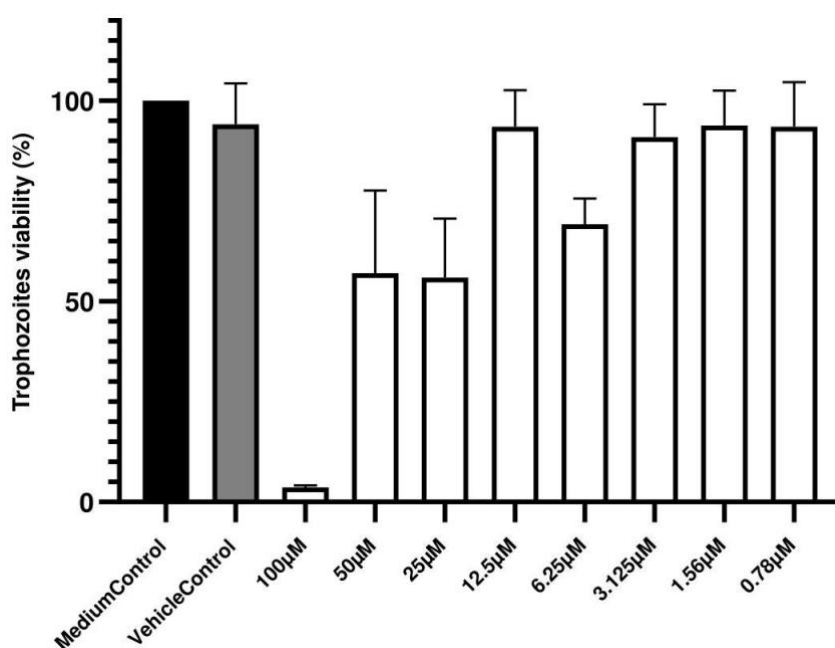


**Fig. 1** Anti-*T. foetus* activity of synthetic chalcones. Trichomonocidal activity was determined considering the viability of the parasites, as described in the methodology. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation compared to vehicle control (considering the trophozoite viability as 100%).

From the results of the anti-*T. foetus* activity assay, the IC<sub>50</sub> values of chalcones Li-43 and Li-83 were determined as 2.2  $\mu$ M (Figure 2) and 24.6  $\mu$ M (Figure 3), respectively.



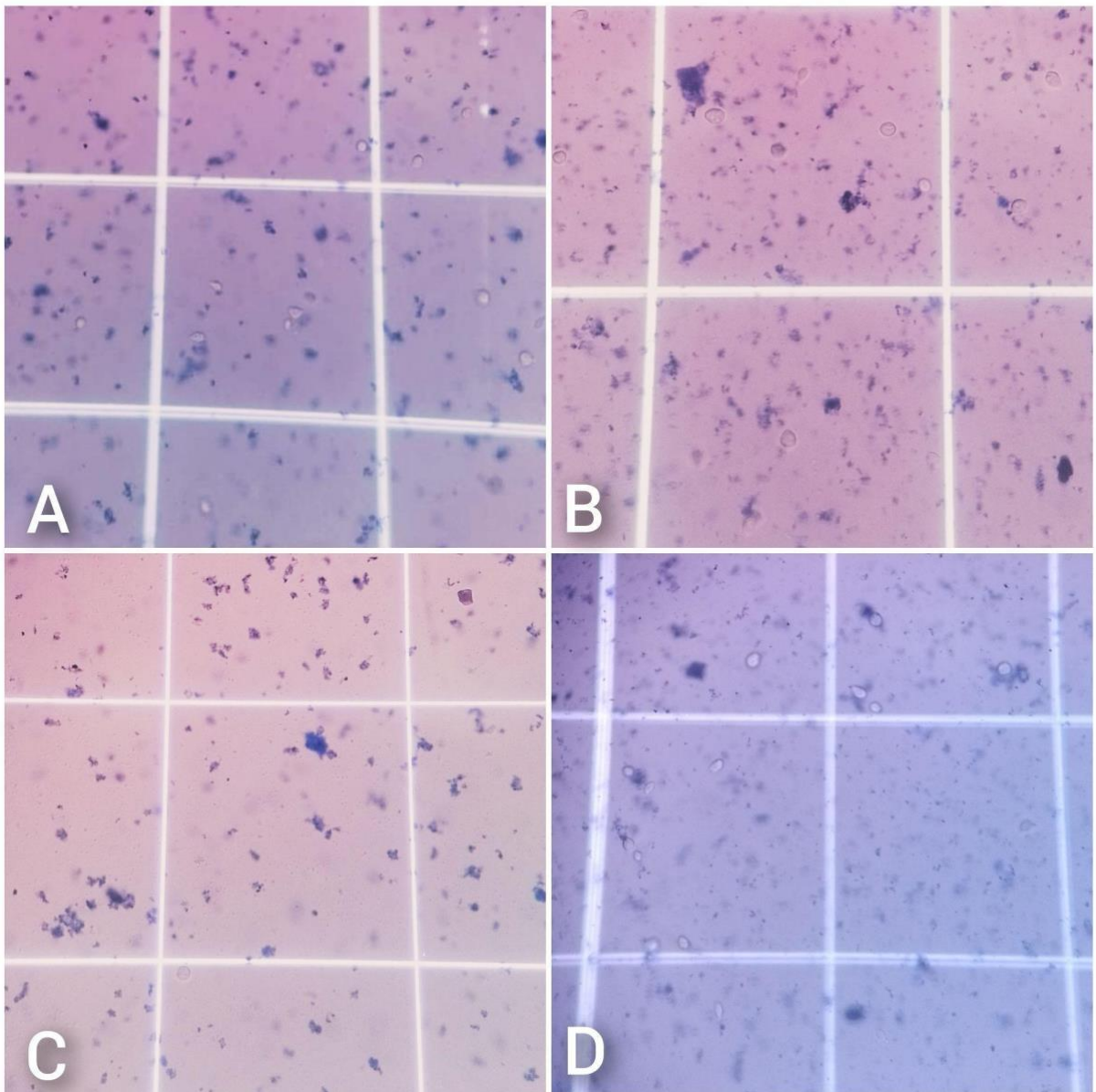
**Fig. 2** Serial dilution of compound Li-43 to perform  $IC_{50}$  determination against *T. foetus*. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation compared to control.



**Fig. 3** Serial dilution of compound Li-83 to perform  $IC_{50}$  determination against *T. foetus*. Data are presented as mean  $\pm$  standard deviation compared to control.

Under light microscopy analysis of the microplate well content it was possible to observe that Li-83 treated-trophozoites had their viability greatly affected when compared with controls (Figure 4).

As expected, viable parasites were observed in control with only TYM medium (without chalcone), and most of the organisms remained with normal morphology, in pyriform shape, and motility (Figure 4A). In the vehicle control (DMSO), the parasites remained with a similar viability as the control (Figure 4B). In contrast, Li-83 treated-trophozoites at highest concentration (100  $\mu\text{M}$ ) had their viability strongly reduced with only one trophozoite in the hemocytometer analyzed (Figure 4C). At the lowest concentration of chalcone Li-83 (0.78  $\mu\text{M}$ ), the density, morphology, and motility were very close to those of control, demonstrating that low concentration of Li-83 does not significantly interfere with the viability of *T. foetus* (Figure 4D). This result is in agreement with the IC50 value, 22.4  $\mu\text{M}$ .



**Fig. 4** Optical microscope images of *T. foetus* trophozoites in the serial dilution experiment of chalcone Li-83. A: parasite control; B: DMSO vehicle control; C: parasite in contact with 100 μM Li-83; D: parasite in contact with 0.78 μM Li-83. The arrows point to some of the observed trophozoites.

## Discussion

Trichomoniasis affects the reproductive tract of cattle, causing a major economic impact for the producer, in addition to affecting the gastrointestinal tract of domestic felines, making these animals an important source of infection for others of the same species (Rush; Slapeta, 2021). In both species, there is no effective treatment. The use of ronidazole in felines has limitations, as there are cases of resistance and the drug does not completely eliminate the parasite (Hinney et al, 2019). The search for new therapeutic approaches is essential for the complete resolution of the disease (Gooking et al, 2010).

Chalcones are precursor molecules of flavonoids and isoflavonoids that have high biological value (WalyEldeen et al, 2023), with proven efficacy against the human trichomoniasis protozoan, *Trichomonas vaginalis* (Neves et al, 2020). Studies have proven the action of chalcones on the parasites *Leishmania amazonensis* and *Leishmania infantum* and it is believed that the lipophilicity of the compounds, influenced by prenylated groups (such as *O*-isoprenyl, *O*-farnesyl and *O*-geranyl), allows chalcones to cross the parasite membrane more effectively. The position of the prenylate groups has a direct influence on the biological activity of the compounds (Passalacqua et al, 2015). Regarding the parasite *Toxoplasma gondii*, the Michael acceptor structure of chalcones, which can react with parasite target enzymes, is essential to inhibit enzyme activities indispensable for the survival of the protozoan (Jiang et al, 2022). According to Trein et al, 2018, the presence and position of the amino group in the A ring of chalcones is important in the antiprotozoal activity of the compound against *T. vaginalis*, but the exact mechanism of action needs further studies. Subsequently, studies have highlighted that hydroxylated chalcones, such as 4HC, have high antiparasitic activity against *T. vaginalis* and it is believed that the compound's mechanism of action is related to the affinity of 4HC with the catalytic site of the purine nucleoside phosphorylase (TvPNP) (Oliveira et al, 2023).

In the present study the synthetic chalcones Li-43 and Li-83 showed potent activity against *T. foetus* ( $IC_{50}$  = 2.2  $\mu$ M and 24.6  $\mu$ M, respectively), while Li-36, Li-77, Li-34, Li-40 and Li-41 demonstrated lower inhibition power against trophozoites. Importantly, preliminary evaluation by light microscopy of 100  $\mu$ M Li-83 treated-trophozoites showed low numbers and affected organisms with alteration of morphology to round shape without motility. Studies involving the elucidation of the mechanism of action of synthetic chalcones on *T. foetus* are in progress.



## Conclusion

Of the twenty synthetic chalcones tested, two showed a high capacity to inhibit *Tritrichomonas foetus* trophozoites, namely Li-43 and Li-83, standing out as promising candidates in the search for new treatments for the infection. Further determination of selectivity and investigation of the mechanism of action of these chalcones are necessary.

## Funding

This study received financial support from National Institute of Science and Technology in 3D Printing and Advanced Materials Applied to Human and Veterinary Health - INCT 3D-Saúde, funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brazil (Grant #406436/2022-3). L.T.S. thanks the fellowship from CNPq and T.T. thanks the researcher fellowship (grant 309764/2021-1) from CNPq.

## References

- Alves Borges Leal AL, Teixeira da Silva P, Nunes da Rocha M, Marinho EM, Marinho ES, Marinho MM, Bandeira PN, Sampaio Nogueira CE, Barreto HM, Rodrigues Teixeira AM, Silva Dos Santos H (2021) Potentiating activity of Norfloxacin by synthetic chalcones against NorA overproducing *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog.* 155:104894.
- Dąbrowska J, Karamon J, Kochanowski M, Jędryczko R, Cencek T (2015) *Tritrichomonas foetus* infection in cat – first detection in Poland. *Acta Parasitologica* 60(4): 605-8.
- das Neves RN, Sena-Lopes, Alves MSD, da Rocha Fonseca B, da Silva CC, Casaril AM, Savegnago L, de Pereira CMP, Ramos DF, Borsuk S (2020) 2'-Hydroxychalcones as an alternative treatment for trichomoniasis in association with metronidazole. *Parasitol Res.* 119(2):725-736.
- DO, Rae, JE, Crews (2006) *Tritrichomonas foetus*. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 22(3): 595-611.
- Duarte M, Giordani RB, Carli GA, Zuanazzi JA, Macedo AJ, Tasca T (2009) Cytotoxicity of solubilization vehicles for *Trichomonas gallinae* and *Tritrichomonas foetus* measured by the resazurin microtiter assay. *Vet Parasitol.* 166(1-2):167-70.

Gookin JL, Hanrahan K, Levy MG (2017) The conundrum of feline Trichomonosis. *J Feline Med Surg* 19(3): 261-274.

Gookin JL, Stauffer SH, Dybas D, Cannon DH (2010) Documentation of in vivo and in vitro aerobic resistance of feline *Tritrichomonas foetus* isolates to ronidazole. *J Vet Intern Med.* 24(4):1003-7.

Hinney B, Christen I, Jähne S, Gaisbauer S, Schrammel N, Markl A, Joachim A, Künzel F (2019) Efficacy and safety of ronidazole treatment against *Tritrichomonas foetus* in a cat colony with multiple disorders. *Vet Parasitol Reg Stud Reports.* 18:100344.

Jasim HA, Nahar L, Jasim MA, Moore SA, Ritchie KJ, Sarker SD (2021) Chalcones: Synthetic Chemistry Follows Where Nature Leads. *Biomolecules* 11(8):1203.

Jiang L, Liu B, Hou S, Su T, Fan Q, Alyafeai E, Tang Y, Wu M, Liu X, Li J, Hu Y, Li W, Zheng Z, Liu Y, Wu J (2022) Discovery and evaluation of chalcone derivatives as novel potential anti-*Toxoplasma gondii* agents. *Eur J Med Chem.* 234:114244. doi: 10.1016/j.ejmech.2022.114244. Epub 2022 Mar 5. PMID: 35278752.

LeVine DN, Papich MG, Gookin JL, Davidson GS, Davis JL, Hayes RB (2011) Ronidazole pharmacokinetics after intravenous and oral immediate-release capsule administration in healthy cats. *J Feline Med Surg.* 13(4):244-50.

Oliveira LR, Trein MR, Assis LR, Rigo GV, Simões LPM, Batista VS, Macedo AJ, Trentin DS, Nascimento-Júnior NM, Tasca T, Regasini LO (2023) Phenolic chalcones as agents against *Trichomonas vaginalis*. *Bioorg Chem.* 141:106888. doi: 10.1016/j.bioorg.2023.106888. Epub 2023 Sep 28. PMID: 37839143.

Passalacqua TG, Dutra LA, de Almeida L, Velásquez AM, Torres FA, Yamasaki PR, dos Santos MB, Regasini LO, Michels PA, Bolzani Vda S, Graminha MA (2015) Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. *Bioorg Med Chem Lett.* 25(16):3342-5. doi: 10.1016/j.bmcl.2015.05.072. Epub 2015 May 30. PMID: 26055530.

Rush GM, Šlapeta J (2021) Evidence of self-resolution of feline trichomonosis in a pair of single household cats due to ronidazole-resistant *Tritrichomonas foetus*. *Vet Parasitol.* 300:109609.

Tolbert, MK, Gooking, JL (2016) Mechanisms of *Tritrichomonas foetus* Pathogenicity in Cats with Insights from Venereal Trichomonosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 30(2): 516-526.

Traversari G, Delogu F, Aparicio S, Cincotti A (2022) hMSCs in contact with DMSO for cryopreservation: Experiments and modeling of osmotic injury and cytotoxic effect. *Biotechnol Bioeng.* 119(10):2890-2907.

Trein MR, Rodrigues E Oliveira L, Rigo GV, Garcia MAR, Petro-Silveira B, da Silva Trentin D, Macedo AJ, Regasini LO, Tasca T (2018) Anti-Trichomonas vaginalis activity of chalcone and amino-analogues. *Parasitol Res.* 118(2):607-61.

WalyEldeen AA, Sabet S, El-Shorbagy HM, Abdelhamid IA, Ibrahim SA (2023) Chalcones: Promising therapeutic agents targeting key players and signaling pathways regulating the hallmarks of cancer. *Chem Biol Interact.* 5;369:110297.

Wangngae S, Chansaenpak K, Nootem J, Ngivprom U, Aryamueang S, Lai RY, Kamkaew A. (2021) Photophysical Study and Biological Applications of Synthetic Chalcone-Based Fluorescent Dyes. *Molecules* 26(10):2979.

Yule, A, Skirrow, SZ, Bonduran, RH (1989) Bovine Trichomoniasis. *Parasitol Today* 5(12): 373-7.

Zhuang C, Zhang W, Sheng C, Zhang W, Xing C, Miao Z (2017) Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chem Rev.* 117(12):7762-7810.

### 3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

*Tritrichomonas foetus* é um importante agente infeccioso que acomete o trato reprodutivo de bovinos e o trato gastrointestinal de gatos domésticos, ocasionando manifestações clínicas relevantes que impactam diretamente no bem-estar e qualidade de vida de ambas as espécies. Em razão da falta de opções terapêuticas adequadas, é de grande relevância para a Medicina Veterinária o estudo e a pesquisa por compostos capazes de diminuir a viabilidade de trofozoítos de *T. foetus*. Esse estudo demonstrou que chalconas sintéticas são estruturas promissoras que podem vir a contribuir para a resolução da doença e consequentemente a redução dos impactos econômicos causados pelo parasito em bovinos, assim como a redução de felinos que possam permanecer infectados pelo resto da vida enquanto disseminam a infecção para animais sadios. Pensando em estudos futuros, é importante a avaliação dos efeitos de chalconas sintéticas em células de bovinos e felinos, com o objetivo de garantir que os compostos não sejam tóxicos para as células animais. Além disso, pesquisas sobre o mecanismo de ação das chalconas sobre *T.foetus* e estudos *in vivo* são fatores relevantes para o reconhecimento dessas estruturas como tratamento para a tricomoníase em animais.

## REFERÊNCIAS

- BASTOS, BETH NIA FERREIRA; ALMEIDA, FLAVYA MENDES; BRENER, BEATRIZ. What is known about *Tritrichomonas foetus* infection in cats? **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Brasil, v. 28, ed. 1, p. 1-11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612019005>. Acesso em: 03 jul. 2024.
- BONDURANT, ROBERT H. Venereal diseases of cattle: natural history, diagnosis, and the role of vaccines in their control. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Amsterdam, v. 21, ed. 2, p.383-408, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2005.03.002>. Acesso em: 01 jul. 2024.
- BRUGEROLLE G, LEE J. The Illustrated Guide to the Protozoa. Lawrence: Society of Protozoologists, 2000.
- CALVANI, NICHOLA ELIZA DAVIES et al. Not gone but forgotten: *Tritrichomonas foetus* in extensively-managed bulls from Australia's Northern Territory. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, Amsterdam, v. 1, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crvbd.2021.100012>. Acesso em: 01 jul. 2024.
- CRISI, PAOLO E et al. *Tritrichomonas foetus* in cats from Central Italy: Clinical signs and risk factors. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, Italia, v. 24, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2021.100577>. Acesso em: 03 jul. 2024.
- DABROWSKA, JOANNA et al. *Tritrichomonas foetus* as a causative agent of tritrichomonosis in different animal hosts. **Journal of Veterinary Research**, Estados Unidos, v. 63, ed. 4, p. 533-541, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.2478/jvetres-2019-0072>. Acesso em: 04 jul. 2024.
- FILHA, E. SPÓSITO; OLIVEIRA, S. M. Tricomonose Bovina. **Instituto Biológico**, São Paulo, v. 71, ed. 1, p. 9-11, 2009. Disponível em: [http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v71\\_1/sposito1.pdf](http://www.biologico.agricultura.sp.gov.br/uploads/docs/bio/v71_1/sposito1.pdf). Acesso em: 04 jul. 2024.
- FILHO, RUY BRAYNER DE OLIVEIRA et al. Prevalence and risk factors associated with *Tritrichomonas foetus* infection in cattle in the state of Paraíba, Brazil. **Acta Parasitologica**, Brasil, v. 63, ed. 2, p. 346-353, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1515/ap-2018-0039>. Acesso em: 03 jul. 2024.
- HINNEYA, BARBARA et al. Efficacy and safety of ronidazole treatment against *Tritrichomonas foetus* in a cat colony with multiple disorders. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, Austria, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100344>. Acesso em: 8 jul. 2024.
- JIN, YINZHU; DU, AIFANG; YAO, CHAOQUN. Clinical isolates of *Tritrichomonas foetus* in bulls in Wyoming, South Dakota and Montana, USA. **BMC Veterinary Research**, Estados Unidos, v. 16, ed. 12, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12917-020-2229-6>. Acesso em: 01 jul. 2014.

- LEVINE, DANA N et al. Ronidazole pharmacokinetics after intravenous and oral immediate-release capsule administration in healthy cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, Estados Unidos, v. 13, ed. 4, p.244-250, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2010.12.001>. Acesso em: 8 jul. 2024.
- MANNING, KRISTIN. Update on the Diagnosis and Management of Tritrichomonas foetus Infections in Cats. **Topics in Companion Animal Medicine**, Estados Unidos, v. 25, ed. 3, p. 145-148, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1053/j.tcam.2010.08.001>. Acesso em: 03 jul. 2024.
- OLIVEIRA, LÍGIA R et al. Phenolic chalcones as agents against Trichomonas vaginalis. **Bioorganic Chemistry**, Brasil, v. 141, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2023.106888>. Acesso em: 04 jul. 2024.
- ONDRAK, JEFF D. Tritrichomonas foetus Prevention and Control in Cattle. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Amsterdam, v. 32, ed. 2, p.411-423, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2016.01.010>. Acesso em: 01 jul. 2024.
- POZZETTI LUCA et al. Total Synthesis of the Natural Chalcone Lophirone E, Synthetic Studies toward Benzofuran and Indole-Based Analogues, and Investigation of Anti-Leishmanial Activity. **Molecules**, Itália, v. 27, ed. 2, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules27020463>. Acesso em: 04 jul. 2024.
- RAE, D OWEN; CREWS, JOHN. Tritrichomonas foetus. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, Amsterdam, v. 22, ed. 3, p.595-611, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cvfa.2006.07.001>. Acesso em: 01 jul. 2024.
- RUSH, GEMMA MARIE; SLAPETA, JAN. Evidence of self-resolution of feline trichomonosis in a pair of single household cats due to ronidazole-resistant Tritrichomonas foetus. **Veterinary Parasitology**, Austrália, v. 300, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109609>. Acesso em: 11 jul. 2024.
- SCHROEDER, MEGAN E, et al. Detection of Tritrichomonas foetus by RT-rtPCR in pooled bovine preputial washings. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, California, v. 35, ed. 2, p.178-181, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/10406387221149407>. Acesso em: 01 jul. 2024.
- WANGNGAE SIRILAK et al. Photophysical Study and Biological Applications of Synthetic Chalcone-Based Fluorescent Dyes. **Molecules**, Tailândia, v. 26, ed. 10, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules26102979>. Acesso em: 03 jul. 2024.
- YAO, CHAOQUN; KOSTER, LIZA S. Tritrichomonas foetus infection, a cause of chronic diarrhea in the domestic cat. **Veterinary Research**, Estados Unidos, v. 46, ed. 1, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0169-0>. Acesso em: 03 jul. 2024.
- YULE, A; SKIRROW, S. Z; BONDURAN, R. H. Bovine Trichomoniasis. **Parasitol Today**, Reino Unido, v. 5, ed. 12, p.373-377, 1989. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(89\)90298-6](https://doi.org/10.1016/0169-4758(89)90298-6). Acesso em: 01 jul. 2024.