



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

ANA CATARINA CRISTOVÃO SILVA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DOS MECANISMOS CELULARES E
MOLECULARES DE DERIVADOS FENOXI-HIDRAZINO-TIAZÓIS CANDIDATOS
A FÁRMACOS TRIPANOCIDAS**

Recife

2022

ANA CATARINA CRISTOVÃO SILVA

**AVALIAÇÃO *IN SILICO* E *IN VITRO* DOS MECANISMOS CELULARES E
MOLECULARES DE DERIVADOS FENOXI-HIDRAZINO-TIAZÓIS CANDIDATOS
A FÁRMACOS TRIPANOCIDAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientador: Dr. Marcelo Zaldini Hernandez

Co-orientadores: Dra. Valéria Pereira Hernandez

Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Recife

2022

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Silva, Ana Catarina Cristovão

Avaliação *in silico* e *in vitro* dos mecanismos celulares e moleculares de derivados fenoxi-hidrazino-tiazóis candidatos a fármacos tripanocidas / Ana Catarina Cristovão Silva. - 2022.

180 f. : il.

Orientador: Dr. Marcelo Zaldini Hernandez.

Coorientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandez.

Coorientadora: Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2022.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Chagas, Doença de. 2. Tripanossomo. 3. Farmacologia. I. Hernandez, Marcelo Zaldini (orientador). II. Hernandez, Valéria Pereira (coorientadora). III. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de (coorientadora). IV. Título.

616.9363

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-093-2022

ANA CATARINA CRISTOVÃO SILVA

Avaliação *in silico* e *in vitro* dos mecanismos celulares e moleculares de derivados fenoxi-hidrazino-tiazóis candidatos a fármacos tripanocidas

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Desenvolvimento Pré-clínico de Produtos Bioativos.

Aprovada em: **03/03/2022**

BANCA EXAMINADORA

Dr. Marcelo Zaldini Hernandez

Depto. de Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Dr^a Teresinha Gonçalves da Silva

Depto. de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

Dr. Fábio Rocha Formiga

Depto. de Imunologia – Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

Dr^a Elis Dionísio da Silva

Depto. de Imunologia – Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

Dr. Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira

Depto. de Ciências Farmacêuticas – Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo Roberto e Maria Aparecida, meus maiores incentivadores que me apoiaram e me orientaram em minhas decisões. Obrigada por acreditarem em mim desde sempre.

A minha irmã, Ana Carolina, pela paciência e pelas palavras de força e incentivo sempre que eu achava que não podia mais.

A minha sobrinha, Maria Luísa. Você é minha luz e espero ser um exemplo para você um dia.

Aos meus amigos desde a época do colégio. Vocês têm me acompanhado em muitos momentos da minha vida e os feito sempre mais leves.

A meu orientador Marcelo Zaldini, pelo aprendizado, por me ajudar a crescer pessoal e profissionalmente.

A minha co-orientadora Carolina pela paciência em me repassar seus conhecimentos, por ter me auxiliado de maneira excepcional sempre que podia. Você foi minha maior incentivadora científica.

A minha co-orientadora Valéria por ter me dado a oportunidade de participar e colaborar com seu grupo de pesquisa desde 2014. Trabalhar com uma profissional como você é um grande privilégio.

A todos os meus colegas de laboratório, os que ainda estão e os que saíram, cada um contribuiu à sua maneira para a realização desse trabalho, bem como tornando os experimentos sempre mais leves e divertidos.

Ao Instituto Aggeu Magalhães e à UFPE por fornecerem a estrutura e os equipamentos necessários para o desenvolvimento do meu projeto.

RESUMO

A doença de Chagas é considerada negligenciada e possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*. O seu tratamento é feito com o benzonidazol (Bzn), o qual é muito tóxico e mais efetivo apenas na fase aguda da doença, sendo a descoberta de fármacos mais eficazes e menos tóxicos um desafio. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar *in silico* e *in vitro* treze novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis. Para avaliação *in silico*, foram utilizadas plataformas para busca de possíveis alvos de atividade biológica. Além disso, foi realizado o *docking* molecular frente a alvos de *T. cruzi*, citotoxicidade e do sistema imune. Foi avaliada a citotoxicidade celular, a atividade tripanocida, a produção de óxido nítrico (ON), a morte celular e a imunomodulação dos compostos testados. Após o *docking* em alvos de *T. cruzi*, foi verificada maior afinidade predita dos compostos pelas enzimas esqualeno sintase e 14-alfa demetilase. No *docking* com as enzimas monoamina oxidase A e B, verificou-se a afinidade predita para JM-13. No *docking* com alvos do sistema imune, verificou-se maior afinidade predita dos compostos por TLR2 e TLR4. No geral, os compostos foram pouco tóxicos *in vitro* para a maioria dos tipos celulares testados. O composto mais ativo para epimastigotas foi LIZ-531 (2,8 μ M), para tripomastigotas foi LIZ-311 (8,6 μ M) e para amastigotas foi LIZ-331 (1,9 μ M). Houve indução da produção de ON na concentração de 200 μ g/mL por LIZ-311 (2,5 μ M), LIZ-431 (4,1 μ M) e LIZ-531 (5 μ M) e JM-14 induziu a produção de ON nas 3 maiores concentrações testadas. Avaliando a produção de citocinas, LIZ-331 induziu a produção de TNF e IL-6, já LIZ-311, de TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17. O composto LIZ-311 induziu morte celular principalmente por apoptose, diminuindo compartimentos ácidos e o potencial de membrana mitocondrial. Diante do exposto, verifica-se o potencial de LIZ-311, pois além da atividade antiparasitária, foi pouco tóxico, com potencial imunomodulador *in silico* e *in vitro*, além de induzir a morte parasitária por via apoptótica.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Imunomodulação; *Trypanosoma cruzi*; Fármacos; Métodos computacionais.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected disease and its etiologic agent is *Trypanosoma cruzi*. Its treatment is done with benznidazole (Bzn), which is very toxic and more effective only in the acute phase of the disease, being the discovery of more effective and less toxic drugs a challenge. Therefore, the objective of this work was to investigate *in silico* and *in vitro* thirteen new phenoxyhydrazine-thiazole compounds. For *in silico* evaluation, platforms were used to search for possible targets of biological activity. In addition, molecular docking was performed with targets of *T. cruzi*, cytotoxicity and the immune system. Cell cytotoxicity, trypanocidal activity, nitric oxide (NO) production, cell death and immunomodulation of the compounds were evaluated. After docking in *T. cruzi* targets, a higher predicted affinity of the compounds for the squalene synthase and 14-alpha demethylase enzymes was observed. In docking with monoamine oxydase A and B, the predicted affinity for JM-13 was verified. In docking with immune system targets, there was a higher predicted affinity of the compounds for TLR2 and TLR4. Overall, the compounds were mildly toxic *in vitro* for most cell types. The most active compound for epimastigotes was LIZ-531 (2.8 μ M), for trypomastigotes was LIZ-311 (8.6 μ M) and for amastigotes was LIZ-331 (1.9 μ M). There was an induction of NO production at a concentration of 200 μ g/mL by LIZ-311 (2.5 μ M), LIZ-431 (4.1 μ M) and LIZ-531 (5 μ M) and JM-14 induced NO production in 3 highest concentrations tested. Regarding the production of cytokines, LIZ-331 induced the production of TNF and IL-6, whereas LIZ-311 induced TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-10, IL-17. The compound LIZ-311 induced cell death by apoptosis, decreasing acidic compartments and the mitochondrial membrane potential. In view of the above, the potential of LIZ-311 is verified, since in addition to the antiparasitic activity, it was not very toxic, with immunomodulatory potential *in silico* and *in vitro*, in addition to inducing parasitic death by apoptotic pathway.

Key words: Chagas disease; Immunomodulation; *Trypanosoma cruzi*; Drugs; Computational methods.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Transmissão da doença de Chagas pelos vetores triatomíneos.....	25
Figura 2 – Desenho esquemático das formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 3 – Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	28
Figura 4 – Estruturas intracelulares da forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	30
Figura 5 – Fluxograma para diagnóstico laboratorial da doença de Chagas aguda.....	31
Figura 6 – Fluxograma do diagnóstico laboratorial na fase crônica da doença de Chagas	32
Figura 7 – Radiografias de algumas das apresentações clínicas da doença de Chagas.....	33
Figura 8 – Estruturas químicas dos fármacos utilizados na doença de Chagas.....	42
Figura 9 – Estrutura geral dos compostos LIZ e JM, respectivamente.....	58
Figura 10 – Fluxograma do <i>docking</i> molecular de fenoxi-hidrazino tiazóis.....	73
Figura 11 – Interações intermoleculares entre LIZ-521-ZE e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.....	77
Figura 12 – Interações intermoleculares entre LIZ-431-EZ e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da 14-alfa demetilase.....	79
Figura 13 – Interações intermoleculares entre LIZ-521-EE e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da esqualeno sintase.....	81
Figura 14 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da tripanotiona redutase.....	83
Figura 15 – Interações intermoleculares entre JM-15-EE e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da MAOA.....	86
Figura 16 – Interações intermoleculares que ocorrem entre o composto JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio da MAOB	88
Figura 17 – Interações intermoleculares entre LIZ-421-EE e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de TRL2.....	92
Figura 18 – Interações intermoleculares entre JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de TRL4.....	93
Figura 19 – Interações intermoleculares que ocorrem entre o composto JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IFNGR.....	95
Figura 20 – Interações intermoleculares entre JM-15-EZ e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de TNFR.....	96

Figura 21 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL2R	98
Figura 22 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL4R	99
Figura 23 – Interações intermoleculares entre JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL6R	101
Figura 24 – Interações intermoleculares entre JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL10R	102
Figura 25 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL17R	104

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Dados <i>in silico</i> de lipofilicidade (iLogP, XLogP, WLogP, MLogP e Consensus LogP) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.....	66
Gráfico 2 – Variação dos valores de <i>score</i> (ChemPLP) para cada alvo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	74
Gráfico 3 – Resumo das interações intermoleculares entre os compostos e os alvos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	75
Gráfico 4 – Variação dos valores de energia de ligação (kcal/mol) para cada alvo de toxicidade.....	84
Gráfico 5 – Resumo das interações intermoleculares entre os compostos e os alvos de toxicidade.....	84
Gráfico 6 – Variação dos valores de energia de ligação (kcal/mol) para cada alvo do sistema imune	89
Gráfico 7 – Resumo das interações intermoleculares entre os compostos e os alvos imunológicos	90
Gráfico 8 – Produção de óxido nítrico após estímulo de macrófagos com 200 µg/mL dos compostos LIZ-311, LIZ-431 e LIZ-531.....	112
Gráfico 9 – Produção de óxido nítrico após estímulo de macrófagos com o composto JM-14	112
Gráfico 10 – Indução da produção da citocina TNF- α pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.	114
Gráfico 11 – Indução da produção da citocina IFN- γ pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331	115
Gráfico 12 – Indução da produção da citocina IL-2 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331	116
Gráfico 13 – Indução da produção da citocina IL-4 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331	117
Gráfico 14 – Indução da produção da citocina IL-6 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.....	118
Gráfico 15 – Indução da produção da citocina IL-10 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331	119
Gráfico 16 – Indução da produção da citocina IL-17 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.	120

Gráfico 17 – <i>Dot plots</i> do perfil de morte celular (Anexina-V/Iodeto de propídio) avaliado por citometria de fluxo.	122
Gráfico 18 – <i>Dot plots</i> do perfil de morte celular (Calceína/homodímero de etídio) avaliado por citometria de fluxo.....	123
Gráfico 19 – Histograma de sobreposição (laranja de acridina) da avaliação por citometria de fluxo do tratamento com LIZ-311 e benzonidazol.....	125
Gráfico 20 – Histograma de sobreposição (rodamina) da avaliação por citometria de fluxo do tratamento com LIZ-311 e benzonidazol.....	126

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Anormalidades de esôfago e cólon na Doença de Chagas baseadas no raio-x.	34
Quadro 2 – Esquema terapêutico para a doença de Chagas.....	43
Quadro 3 – Ensaios clínicos com fármacos para a doença de Chagas.....	44
Quadro 4 – Questões que permanecem sem respostas na doença de Chagas.....	46
Quadro 5 – Critérios aceitáveis e ideais, segundo o DNDi, para o tratamento da doença de Chagas.....	47
Quadro 6 – Critérios propostos para a seleção de alvos.....	50
Quadro 7 – Componentes utilizados para cálculo do <i>docking</i> molecular.....	55
Quadro 8 – Coordenadas utilizadas para definir o ponto central do cálculo de <i>docking</i> no programa AutoDock Vina.....	57
Quadro 9 – Substituintes e pesos moleculares dos compostos LIZ.....	58
Quadro 10 – Dados <i>in silico</i> de parâmetros de solubilidade em água de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.....	65
Quadro 11 – Dados <i>in silico</i> de parâmetros de farmacocinética (absorção pelo trato gastrointestinal e permeabilidade pela barreira hematoencefálica) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.....	67
Quadro 12 – Dados <i>in silico</i> de parâmetros de farmacocinética (substrato da glicoproteína P) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.....	67
Quadro 13 – Dados <i>in silico</i> de parâmetros de farmacocinética (inibição de proteínas da superfamília P450) pelo de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados <i>in silico</i> de parâmetros de <i>druglikeness</i> (quantidade de violações de importantes critérios em regras da química medicinal) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis	69
Tabela 2 – Dados <i>in silico</i> de similaridade e predição de acurácia (em porcentagem) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.....	70
Tabela 3 – Classificação predita (<i>in silico</i>) de toxicidade (1 a 6) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.....	71
Tabela 4 – Relatório de Modelo de Toxicidade (<i>in silico</i>) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis	72
Tabela 5 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para cruzafina	76
Tabela 6 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para 14-alfa demetilase.....	78
Tabela 7 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para esqualeno sintase	80
Tabela 8 – Valores de <i>score</i> (ChemPLP) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para tripanotona redutase.....	82
Tabela 9 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para MAOA.....	85
Tabela 10 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para MAOB.....	87
Tabela 11 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para TLR2.....	91
Tabela 12 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para TLR4.....	92
Tabela 13 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IFNGR	94
Tabela 14 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para TNFR.....	95
Tabela 15 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL2R	97

Tabela 16 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL4R	98
Tabela 17 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL6R	100
Tabela 18 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL10R	101
Tabela 19 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de <i>docking</i> dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL17Ra.....	103
Tabela 20 – Atividade citotóxica (CC ₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a esplenócitos murinos	105
Tabela 21 – Atividade citotóxica (CC ₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a fibroblastos (L929)	106
Tabela 22 – Atividade citotóxica (CC ₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a células hepáticas (HepG2)	106
Tabela 23 – Atividade citotóxica (CC ₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a macrófagos (Raw 264.7).....	107
Tabela 24 – Atividade tripanocida (IC ₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (DM28).....	108
Tabela 25 – Atividade tripanocida (IC ₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y).....	108
Tabela 26 – Atividade tripanocida (IC ₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Tulahuen).....	109
Tabela 27 – Índices de seletividade (ISe) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis relativos à forma epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
Tabela 28 – Índices de seletividade (ISe) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis relativos à forma tripomastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	110
Tabela 29 – Índices de seletividade (ISe) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis relativos à forma amastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i>	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AV	Anexina-V
BENDITA	<i>Benznidazole New Doses Improved Treatment & Therapeutic Associations</i>
BENEFIT	<i>Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
Cal	Calceína
CBA	Cytometric Bead Array
CC ₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CHAGASAZOL	<i>Clinical Trial For The Treatment Of Chronic Chagas Disease With Posaconazole And Benznidazole</i>
ConA	Concanavalina A
CYP	Superfamília do citocromo P450
CYP51	Lanosterol 14 α -desmetilase
DCA	Doença de Chagas aguda
DL ₅₀	Dose letal para 50% dos animais
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ES	Esqualeno sintase
ESOL	<i>Estimated Solubility</i>
EthD	Homodímero de etídio
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GIPL	Glicoinositolfosfolípídeo
GPI	Glicosil-fosfaditilinositol

IAM	Instituto Aggeu Magalhães
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% dos parasitos
IFN- γ	Interferon-gama
IgM	Imunoglobulina M
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISe	Índice de seletividade
IV	Índice de variação
LA	Laranja de acridina
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LogP	Coeficiente de partição
LpQM	Laboratório de Planejamento e Síntese em Química Medicinal
LPS	Lipopolissacarídeo
MAOA	Monoamina oxidase A
MAOB	Monoamina oxidase B
MCP	Morte celular programada
MTT	<i>3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide</i>
NE	Não Encontrado
NR	Não Realizado
NK	<i>Natural killer</i>
NTR	Nitrorredutase do tipo 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PAMP	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCDT	Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
P-gP	Glicoproteína P
pH	Potencial hidrogeniônico
PRR	<i>Pattern recognition receptors</i>
Rho 123	Rodamina

RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SB	<i>Score</i> de biodisponibilidade
SEA	<i>Similarity Ensemble Approach</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Tc (I, II, V, VI)	Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>
TESEO	<i>New ThErapies and Biomarkers for ChagaS infEctiOn</i>
TGI	Trato gastrointestinal
Th	<i>T helper</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis fator alpha</i>
TPP	<i>Target Product Profile</i>
TR	Tripanotiona redutase
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivos gerais.....	22
1.1.2	Objetivos específicos	22
1.2	JUSTIFICATIVA	22
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1	EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	24
2.2	ASPECTOS GERAIS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	27
2.3	BIOLOGIA CELULAR DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	29
2.4	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA DE CHAGAS.....	31
2.5	FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS	32
2.6	ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS	34
2.6.1	Infecção aguda	35
2.6.2	Infecção crônica.	38
2.7	TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: ENSAIOS CLÍNICOS E CLASSES PROMISSORAS.....	42
2.8	DESAFIOS NO ESTUDO DE DROGAS PARA A DOENÇA DE CHAGAS 46	
2.9	MÉTODOS COMPUTACIONAIS E O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS	48
2.10	ALVOS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> COM IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS COMPOSTOS PARA DOENÇA DE CHAGAS 49	
2.10.1	Trans-sialidase	50
2.10.2	Nitrorredutase tipo 1 (NTR).....	50
2.10.3	Enzimas envolvidas na síntese do ergosterol.....	51
2.10.4	Tripanotiona redutase (TR).....	52
2.10.5	Cruzaína.	53
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
3.1	ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	54
3.1.1	Definição de características de Absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)	54

3.1.2	Predição de alvos	55
3.1.3	Docking molecular	55
3.1.3.1	Gold.	56
3.1.3.2	AutoDock Vina.....	56
3.2	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	57
3.2.1	Compostos	57
3.2.2	Animais	58
3.2.3	Análise de citotoxicidade	59
3.2.3.1	Obtenção de esplenócitos e avaliação da atividade citotóxica dos compostos frente a células esplênicas.....	59
3.2.3.2	Avaliação da atividade citotóxica em linhagens hepática, fibroblásticas e macrofágicas	60
3.2.4	Avaliação da atividade tripanocida dos compostos	60
3.2.4.1	Epimastigotas.....	60
3.2.4.2	Tripomastigotas	60
3.2.4.3	Amastigotas	61
3.2.5	Dosagem de óxido nítrico (ON) em sobrenadante de cultura de macrófagos	61
3.2.6	Obtenção de sobrenadante de cultura de células esplênicas	62
3.2.7	Dosagem de citocinas por citometria de fluxo	62
3.2.8	Avaliação de morte celular	62
3.2.8.1	Anexina V-7-aminoactinomicina D (AV-7AAD).....	63
3.2.8.2	Calceína/homodímero de etídio	63
3.2.8.3	Avaliação de compartimentos ácidos celulares e potencial de membrana mitocondrial.....	63
3.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	64
4	RESULTADOS	65
4.1	ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	65
4.1.1	Definição de características de Absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)	65
4.1.2	Predição de alvos para toxicidade	69
4.1.3	Predição de alvos de <i>Trypanosoma cruzi</i>	72
4.1.4	Docking molecular	72
4.1.4.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	73

4.1.4.1.1	<i>Cruzaína</i>	75
4.1.4.1.2	<i>14-alfa demetilase</i>	78
4.1.4.1.3	<i>Esqualeno sintase</i>	80
4.1.4.1.4	<i>Tripanotona redutase</i>	81
4.1.4.2	Citotoxicidade.....	83
4.1.4.3	Sistema imune.....	88
4.1.4.3.1	<i>Receptor toll-like 2 (TLR2)</i>	90
4.1.4.3.2	<i>Receptor toll-like 4 (TLR4)</i>	92
4.1.4.3.3	<i>Receptor do interferon gama (IFNGR)</i>	93
4.1.4.3.4	<i>Receptor do fator de necrose tumoral (TNFR)</i>	95
4.1.4.3.5	<i>Receptor da interleucina 2 (IL2R)</i>	97
4.1.4.3.6	<i>Receptor da interleucina 4 (IL4R)</i>	98
4.1.4.3.7	<i>Receptor da interleucina 6 (IL6R)</i>	99
4.1.4.3.8	<i>Receptor da interleucina 10 (IL10R)</i>	101
4.1.4.3.9	<i>Receptor A da interleucina 17 (IL17Ra)</i>	103
4.2	ESTUDOS <i>IN VITRO</i>	104
4.2.1	Atividade citotóxica	104
4.2.1.1	Esplenócitos.....	104
4.2.1.2	L929.....	105
4.2.1.3	HepG2.....	106
4.2.1.4	Raw 264.7.....	107
4.2.2	Atividade tripanocida.....	107
4.2.2.1	Epimastigota	107
4.2.2.2	Tripomastigota.....	108
4.2.2.3	Amastigota.....	109
4.2.3	Índice de seletividade (ISe).....	109
4.2.4	Atividade imunomoduladora.....	111
4.2.4.1	Dosagem de óxido nítrico (ON)	111
4.2.4.2	Dosagem de citocinas	113
4.2.5	Análise de morte celular.....	120
4.2.5.1	Anexina V e 7-AAD	120
4.2.5.2	Calceína/homodímero de etídio.....	123
4.2.5.3	Laranja de acridina e rodamina.....	124
5	DISCUSSÃO	127

6	CONCLUSÃO.....	136
7	PERSPECTIVAS.....	137
	REFERÊNCIAS.....	138
	APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO (<i>FRONTIERS IN PHARMACOLOGY</i>).....	166
	APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO (CYTOKINE & GROWTH FACTORS REVIEWS).....	172
	ANEXO A – CEUA 102/2016.....	180

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada que possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário da família Trypanosomatidae. É um importante problema de saúde pública por atingir principalmente uma parcela da população que possui menores recursos socioeconômicos e menor acesso à saúde (SANMARTINO et al., 2021). O tratamento utilizado atualmente é baseado em duas drogas, o benzonidazol e nifurtimox, porém a eficácia muda de acordo com a fase da doença, sendo mais eficaz na fase aguda em relação à fase crônica, além de possuírem alta toxicidade (ALDASORO et al., 2018). Um dos grandes desafios no tratamento dessa enfermidade é o estudo e descoberta de fármacos mais seletivos ao parasito e menos tóxicos ao indivíduo infectado (MARTÍN-ESCOLANO; MEDINA-CARMONA; MARTÍN-ESCOLANO, 2020).

Para isso, os pesquisadores contam com ferramentas computacionais, de biologia celular e molecular cada vez mais avançadas (SCARIM et al., 2019a). A partir do desenvolvimento dessas ferramentas, tornou-se possível estudar o parasito e encontrar alvos importantes de seu ciclo de vida e, conseqüentemente, tornou-se factível planejar compostos sintéticos para que eles ajam em alvos importantes do ciclo de vida de *T. cruzi*.

Com isso em mente, algumas estratégias vêm sendo empregadas para se obter moléculas com menor toxicidade e maior atividade antiparasitária. Uma dessas estratégias é o uso de espaçadores entre o anel fenílico e a porção tiossemicarbazona. Espíndola (2010) observou que o uso desse espaçador melhorou a atividade tripanocida dos compostos. Outra estratégia de obtenção de compostos visando melhorar a atividade biológica é o bioisosterismo cíclico entre as tiossemicarbazonas e os tiazóis (DA CONCEIÇÃO, 2018).

Além disso, considerando que a eficácia do tratamento está intimamente associada à resposta imune do indivíduo, é de extrema importância que novos compostos sejam investigados com relação a sua atividade imunomoduladora em alvos imunológicos para a doença (RAO et al., 2018).

Com isso em mente, uma série inédita de 13 compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis foi planejada para ser avaliada na presente tese, na perspectiva de elucidar a atividade tripanocidas de novos compostos sintéticos por abordagens *in silico* e *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos gerais

Investigar por métodos *in silico* e *in vitro* os mecanismos celulares e moleculares de uma nova série de fenoxi-hidrazino-tiazóis, candidatos a fármacos tripanocidas.

1.1.2 Objetivos específicos

- a) Avaliar características físico-químicas e de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) dos compostos utilizando ferramentas computacionais para predição dessas características;
- b) Fazer a predição de alvos que possam estar envolvidos no mecanismo de ação dos compostos, utilizando banco de dados;
- c) Avaliar, *in silico*, a afinidade dos compostos por alvos de *T. cruzi* e imunológicos e descrever as razões intermoleculares que justifiquem as diferenças de afinidade entre os compostos;
- d) Determinar a atividade citotóxica em células murinas (esplenócitos) e de linhagem (L929, HepG2, Raw 264.7);
- e) Determinar a atividade antiparasitária das substâncias avaliadas sobre as principais formas evolutivas de *T. cruzi* em cepas suscetíveis (Tulahuen), semi-suscetíveis (cepa Y) e resistentes (Dm28) ao benzonidazol;
- f) Analisar em sobrenadantes de cultura de macrófagos o efeito dos compostos sobre a produção de óxido nítrico;
- g) Avaliar por citometria de fluxo a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 em sobrenadantes de cultura de células esplênicas após tratamento *in vitro* com os compostos;
- h) Avaliar por citometria de fluxo a participação dos compostos na indução de morte celular em tripomastigotas de *T. cruzi*;

1.2 JUSTIFICATIVA

Desde que o tratamento da doença foi descoberto na década de 1960, nenhum outro medicamento foi aprovado. Esse tratamento, além de bastante antigo, possui alta

toxicidade e eficácia variada de acordo com a fase da doença, sendo mais eficaz na fase aguda. Além disso, vem sendo relatada resistência ao tratamento atual por algumas cepas de *T. cruzi* (CAMPOS et al., 2014; MEJIA et al., 2012). Com isso, estudos têm testado novos compostos em uma variedade de cepas com diferentes níveis de resistência ao tratamento atual, tendo como objetivo de se entender melhor o comportamento desses compostos e diminuir as falhas ao avançar nas fases de estudo (DINIZ et al., 2018)

Diferentes classes de compostos vêm sendo investigadas como promissoras para a doença de Chagas. Algumas dessas classes são as dos derivados tiazóis, tio e semicarbazonas, os quais são estruturas privilegiadas extensivamente estudadas com relação a atividade antiparasitária (SCARIM et al., 2019b). Derivados de tiosemicarbazonas tem sido o objeto de estudos biológicos e de nosso grupo de pesquisa devido à sua interessante farmacologia incluindo antiviral, anti-inflamatória, antiprotozoária e propriedades antitumorais (ESPÍNDOLA et al., 2015; GOMES et al., 2016; GUPTA et al., 2016; LEITE et al., 2007; KOBYLINSKA et al., 2016; MOREIRA et al., 2012). Estas moléculas têm mostrado ser particularmente ativas contra diversas espécies como *Leishmania* spp. e *T. cruzi*, tornando essa classe de compostos potenciais agentes quimioterápicos para combater as doenças que estão relacionadas com esses parasitos, como a doença de Chagas.

Para que se descubra uma nova abordagem terapêutica para a doença de Chagas, os métodos computacionais, como o *docking* molecular, têm sido aliados aos ensaios biológicos objetivando uma redução no tempo e no custo de desenvolvimento de um novo fármaco (GELDENDUYS et al., 2006). A utilização dos métodos computacionais, portanto, auxiliam a desenvolver moléculas mais específicas e com menos efeitos adversos, pois é possível fazer predição de: alvos, toxicidade, características de farmacocinética e farmacodinâmica, entre outras (PINZI; RASTELLI, 2019).

Em virtude do que foi mencionado, o presente trabalho visou a avaliação de potenciais protótipos a fármacos tripanocidas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 EPIDEMIOLOGIA DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é um importante problema de saúde pública por atingir principalmente uma parcela da população que possui menores recursos socioeconômicos e menor acesso à saúde. A doença foi descoberta em 1909 pelo médico Carlos Chagas, porém ainda há muito a se entender sobre ela (ÁLVAREZ et al., 2014; BERN, 2015; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Há cerca de 8 milhões de pessoas no mundo com a doença de Chagas, principalmente distribuídas entre os 21 países da América Latina, com taxa de mais de 10.000 mortes/ano associada à doença (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019). O Brasil contribui com mais de 1 milhão desses casos, tendo 13,35% da população sob risco de infecção (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015).

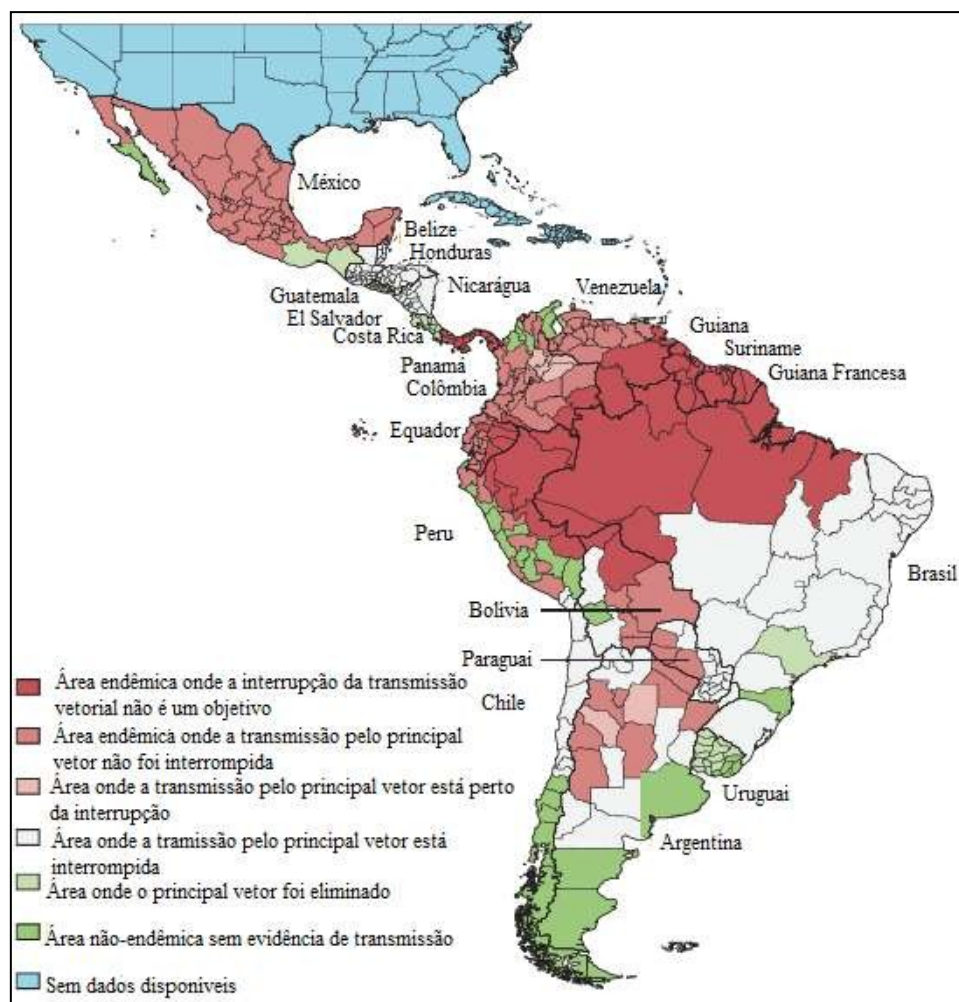
A transmissão da doença de Chagas se dá, classicamente, através das fezes de diversas espécies de vetores triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiro, furão, bicudo, chupança, entre outros. Além da transmissão vetorial, existem outras formas de transmissão que merecem atenção, como por transfusão de sangue, transplante de órgão, via oral e por via vertical (materno-fetal) (FARAL-TELLO et al., 2013).

Nos Estados Unidos, há 11 espécies de vetores documentadas (*Triatoma gerstaeckeri*, *T. incrassata*, *T. indictiva*, *T. lecticularia*, *T. neotomae*, *T. protracta*, *T. recurva*, *T. rubida*, *T. rubrofasciata*, *T. sanguisuga* e *Paratriatoma hirsutae*) e em apenas duas dessas espécies não foi encontrado o *T. cruzi*: *T. incrassata* e *P. hirsuta* (BERN et al, 2011; ZELEDON et al, 2012).

Os principais gêneros dos vetores transmissores da doença são *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus* (COURA, 2015). Mais de 140 espécies de vetores triatomíneos foram descritas, onde 50 foram registradas em nosso país (COURA; DIAS, 2009; GALVÃO et al., 2003). Destas, historicamente 5 espécies se mostraram importantes na manutenção da transmissão por estarem presentes principalmente em áreas domésticas: *Triatoma infestans*, *Panstrongylus megistus*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma pseudomaculata* e *Triatoma sordida* (COURA; DIAS, 2009). Apesar de ter sido uma importante espécie vetorial envolvida na manutenção da doença de Chagas, a transmissão por *T. infestans* foi declarada oficialmente eliminada do Brasil em 2006 devido ao programa de controle desenvolvido em algumas áreas do país em 1950, e que veio a se

tornar nacional no ano de 1983 (PETHERICK, 2010). Na figura 1 é possível ter um panorama da transmissão vetorial da doença de Chagas na América Latina (Central, Norte e Sul) por triatomíneos.

Figura 1 – Transmissão da doença de Chagas pelos vetores triatomíneos.



Fonte: Adaptado de Pérez-Molina e Molina (2018).

Outra via que tem crescido como forma de transmissão, sendo atualmente uma das principais formas de manutenção da transmissão da doença em diferentes levantamentos epidemiológicos, é a via oral. Segundo dados do Ministério da Saúde do Brasil (2012-2016), foram confirmados casos da doença de Chagas aguda (DCA) na maior parte dos estados, com média de casos por ano de 238 casos; a região Norte teve a maior proporção de casos (97,1%); a via oral foi a principal via de transmissão, tendo sido 73% dos casos associados a ela (BRASIL, 2019). Em 2018, foram confirmados 380 casos de DCA, tendo a região Norte a maior proporção de casos do país (92,1%), com

incidência de 1,93 casos/100 mil habitantes e sendo a via oral a principal forma de transmissão da doença (BRASIL, 2019).

Diante desse cenário, tem havido um crescimento no pensamento de que a doença deva ser considerada uma doença transmitida por alimentos (ROBERTSON et al., 2016). Em um levantamento dos casos das doenças parasitárias transmitidas por alimentos, desenvolvido pelo grupo *Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group*, citou-se a doença de Chagas, no entanto, não a incluiu por limitações de recursos (TORGERSON et al., 2015). A ingestão de alimentos *in natura* contaminados, como açaí e cana de açúcar (caldo de cana), está relacionada à grande carga parasitária no hospedeiro, o que resulta em uma fase aguda inicial muito severa e alto índice de mortalidade (PEREIRA et al., 2009). Esse tipo de transmissão tem causado surtos recentes da doença na região Amazônica do Brasil (COSTA et al., 2017; SANTANA et al., 2019; SOUZA-LIMA et al., 2013), mas também em outras regiões. Vargas e colaboradores (2018) demonstraram a associação da transmissão oral da doença por caldo de cana contaminado no estado do Rio Grande do Norte, além de relatar 18 casos da doença neste surto. Recentemente, no ano de 2019, houve um surto da doença em Pernambuco em que houve 29 casos confirmados da DCA e que iniciaram tratamento para a doença (GÓES, 2019).

Para que haja uma mudança desse cenário e controle dessa transmissão, é necessária a correta esterilização dos alimentos. Em 2005, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), criou o regulamento técnico de procedimentos para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais (BRASIL, 2005). No mesmo ano, mais especificamente para o açaí, a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) desenvolveu um protocolo que abrange desde o cultivo à esterilização (BRASIL, 2008).

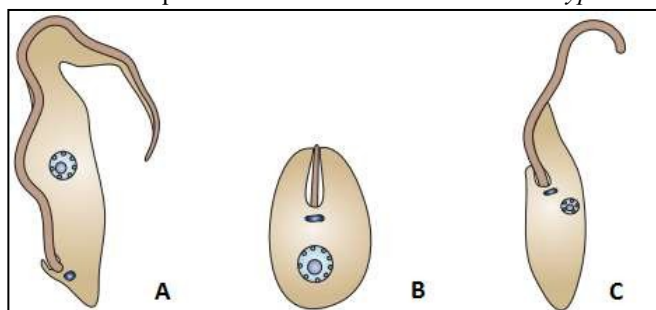
Com o aumento da migração de pessoas entre os países de áreas endêmicas e não-endêmicas (principalmente Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália, Bélgica, Espanha, França, Itália, Reino Unido e Suíça), algumas vias de transmissão ganharam importância: as vias sanguínea, vertical e por transplante de órgãos (COURA; VINÃS, 2010; REQUENA-MÉNDEZ et al., 2015). Devido a isso, faz-se necessário nesses países um *screening* dos prováveis doadores para que diminua o risco de transmissão da doença por essas vias.

Diante do exposto, fica clara a importância epidemiológica da doença. Mesmo após mais de 110 anos de seu descobrimento ainda há a manutenção da transmissão e necessidade de controle, tanto em nível estadual, quanto nacional e mundial.

2.2 ASPECTOS GERAIS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

O agente causador da doença de Chagas, o *T. cruzi*, pertence à Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e ao subgênero Schizotrypanum (DE SOUZA & VIDAL, 2017). O parasito possui três formas evolutivas (figura 2) que se diferenciam através da posição do cinetoplasto, estrutura onde se localiza o DNA (*deoxyribonucleic acid*) mitocondrial nos membros da família Tripanosomatidae, em relação ao núcleo da célula e a posição do flagelo (TEIXEIRA et al., 2011a). A forma amastigota, intracelular obrigatória, possui um flagelo rudimentar e o cinetoplasto se localiza entre o núcleo e o flagelo; a forma epimastigota (presente no tubo digestivo do inseto vetor) possui flagelo e cinetoplasto anteriores ao núcleo; a forma tripomastigota (infectiva e sanguínea circulante) possui cinetoplasto posterior ao núcleo e o flagelo torna-se livre na região anterior.

Figura 2 – Desenho esquemático das formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



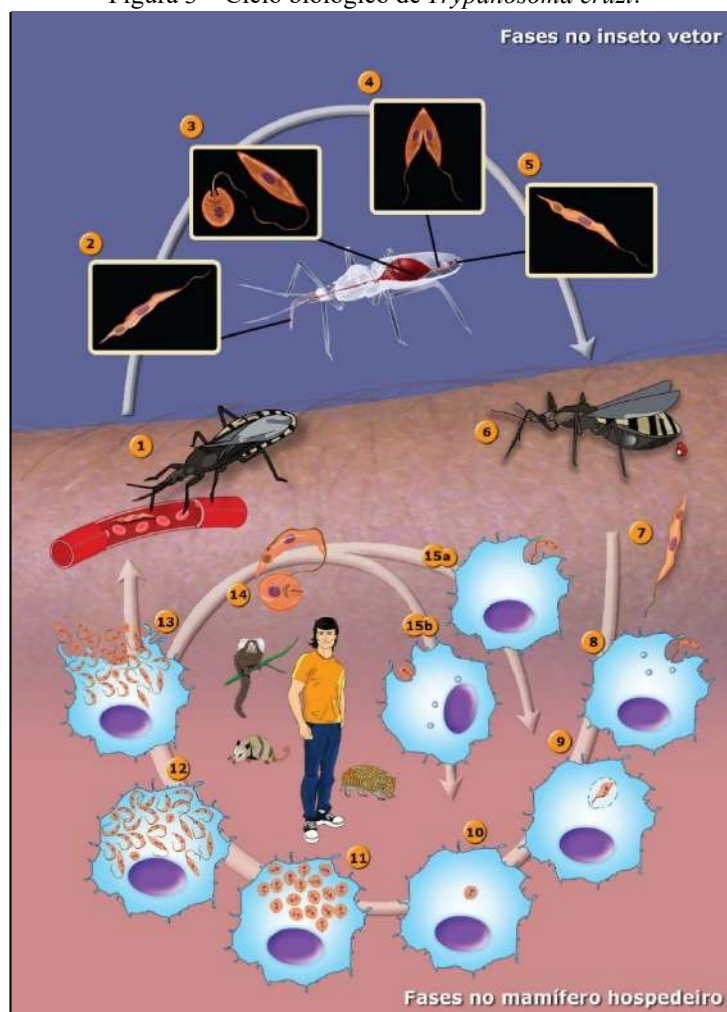
Fonte: Adaptado de Docampo et al. (2005).

Legenda: A – Epimastigota, B – Amastigota, C – Tripomastigota.

O ciclo evolutivo de *T. cruzi* (figura 3) se inicia comumente quando um inseto vetor faz o repasto sanguíneo em um animal ou humano infectado, ingerindo a forma tripomastigota sanguínea (figura 3.1). No estômago do vetor, essa forma evolutiva se diferencia em epimastigotas e em alguns esferomastigotas (figura 3.2-3). Quando alcançam o intestino, os epimastigotas que sobreviveram se dividem por divisão binária (figura 3.4). Após isso, os epimastigotas migram para o intestino posterior do vetor onde começam a se diferenciar em tripomastigotas metacíclicos (forma infectiva, figura 3.5).

Essas formas podem soltar-se do epitélio e serem eliminadas pela urina e pelas fezes do vetor ao fazer o repasto sanguíneo em outro hospedeiro (figura 3.7).

Figura 3 – Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Teixeira et al. (2011).

Legenda: 1-15 Descrição das etapas do ciclo de vida de *T. cruzi*.

Ao fazer o repasto sanguíneo no mamífero, o inseto na maioria das vezes urina e defeca, depositando a forma infectiva (figura 3.7). Ao coçar o local da picada, o parasito pode entrar no hospedeiro através da lesão ocasionada pela picada, porém ele também é capaz de atravessar a pele íntegra. As formas infectivas entram na corrente sanguínea e podem invadir diferentes células nucleadas, como os macrófagos (figura 3.8). Após a fagocitose, forma-se o vacúolo parasitóforo, onde em seu interior o tripomastigota se diferencia em amastigota e há a quebra da membrana do vacúolo (figura 3.9-10). No citoplasma, amastigotas se multiplicam por seguidas divisões binárias (figura 3.11).

Após isso, passam por uma forma de transição antes de tornarem-se tripomastigotas e a célula do hospedeiro é rompida pela grande quantidade de parasitos

(figura 3.12-13). Nem todas as formas amastigotas podem se diferenciar antes do rompimento da célula, o que leva ao aparecimento de diferentes formas fora da célula (figura 3.14). Ainda no meio externo, tripomastigotas e amastigotas podem vir a infectar outras células (figura 3.15a-b). O ciclo se reinicia quando um inseto vetor se alimenta do sangue do hospedeiro infectado.

Antes acreditava-se que apenas os tripomastigotas fossem infectivos às células de mamífero, porém um estudo recente demonstrou que os epimastigotas também podem infectar essas células tanto *in vitro* quanto *in vivo* (KESSLER et al., 2017).

2.3 BIOLOGIA CELULAR DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Por ser eucarioto, *T. cruzi* possui organelas comuns aos eucariotos, além de intrínsecas à família (SOUZA, 2002). O núcleo tem a organização de um núcleo eucariótico com nucléolo no centro. A diferença entre os núcleos das formas evolutivas é que em epimastigotas e amastigotas o núcleo é arredondado, enquanto em tripomastigotas ele é alongado. O retículo endoplasmático se localiza em todo o parasito e em todas as formas evolutivas, o complexo de Golgi está sempre perto da bolsa flagelar, porém em epimastigotas e amastigotas os quais possuem citóstoma, costumam se localizar próximo a ele. O citóstoma possui a função de endocitose, e faz parte do complexo citóstoma-citofaringe, invaginação profunda da membrana citoplasmática apenas dessas formas evolutivas que se estende até próximo ao núcleo (LIMA et al., 2012; PORTO-CARRERO et al., 2000).

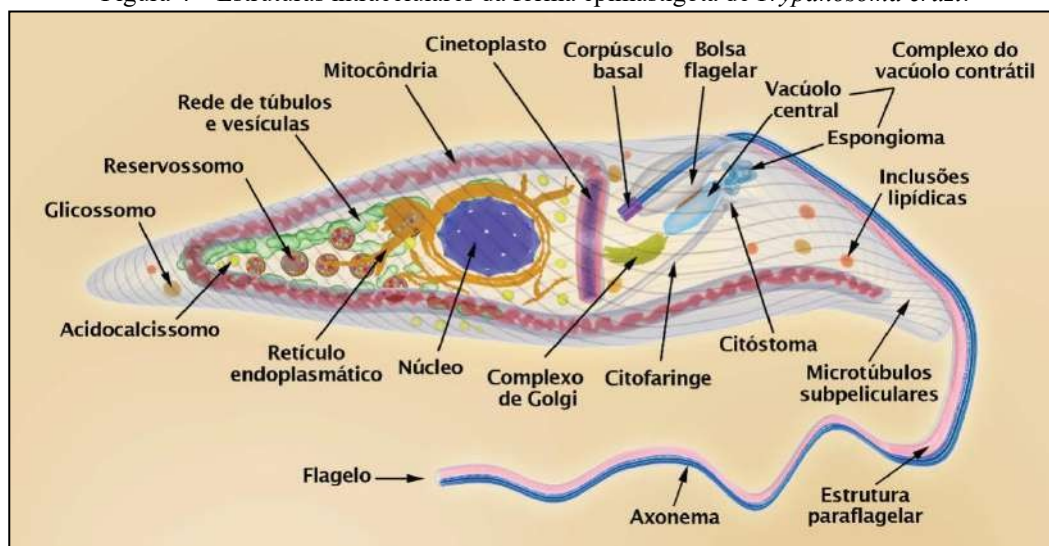
Uma outra estrutura importante é a bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo, o qual é formado por um axonema com nove pares de microtúbulos periféricos e um par central envolvidos por uma membrana flagelar (SOUZA, 2009). Essa região participa de processos importantes, como endocitose, exocitose, motilidade, morfogênese e replicação (DURANTE; CÂMARA; BUSCAGLIA, 2015; LANGOUSIS; HILL, 2014).

Os reservossomos, encontrados na forma epimastigota, são o ponto final dessa via endocítica e uma série de lipídeos, proteínas e proteases, como a enzima cruzaina, são armazenados neles (PEREIRA et al., 2015; SANT'ANNA et al., 2009). As outras formas evolutivas não possuem um reservossomo típico, e sim uma forma relacionada a ele, a qual também contém a cruzaina (BATISTA et al., 2015; SANT'ANNA et al., 2008).

Outras organelas importantes são os acidocalcissomos, compartimentos ácidos ricos em cálcio, fósforo e outros íons, que participam da manutenção de pH (potencial

hidrogeniônico) e osmorregulação (DOCAMPO; MORENO, 2011; DOCAMPO; HUANG, 2015) e os glicosossomos que armazenam enzimas da via glicolítica (MICHELS et al., 2006) (figura 4).

Figura 4 – Estruturas intracelulares da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Teixeira et al. (2011).

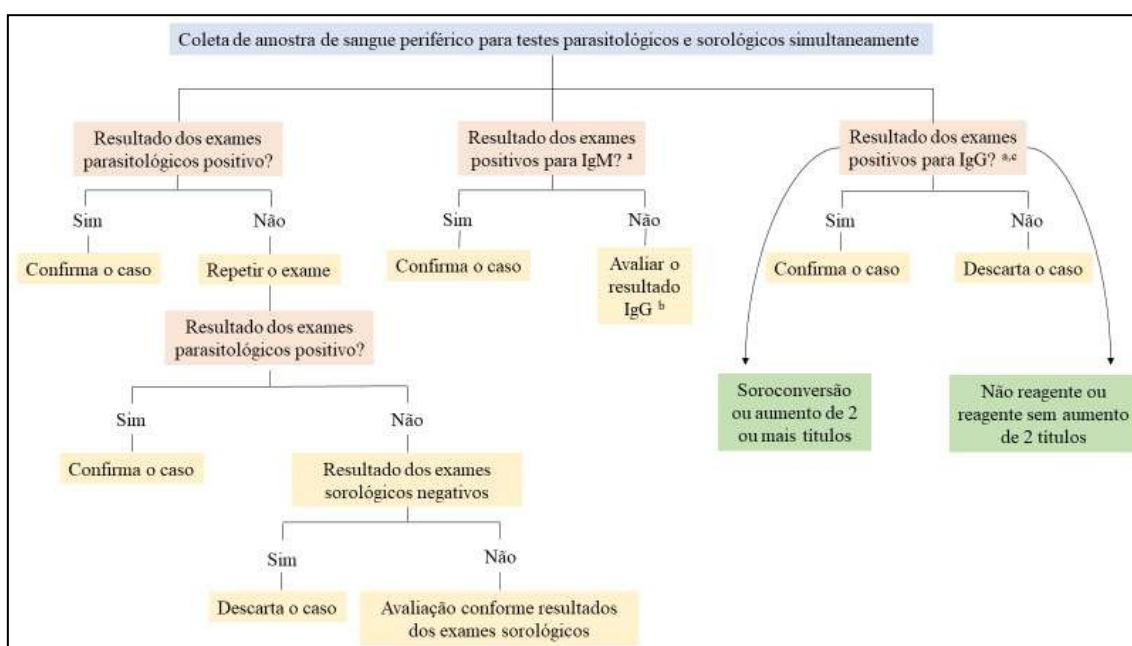
Todos os flagelados da ordem Kinetoplastida têm mitocôndria única que se estende por todo o corpo celular e contém DNA mitocondrial em uma estrutura denominada cinetoplasto (PAES et al., 2011). O volume que essa mitocôndria pode ocupar em relação ao volume total celular varia dependendo de fatores ambientais e nutricionais (SOUZA; ATTÍAS; RODRIGUES, 2009).

Para se diferenciar, adaptar ou evadir ao sistema imune, bem como após a interação com medicamentos, pela ação de espécies reativas de oxigênio, os tripanossomatídeos utilizam a morte celular programada (MCP) (NGUEWA et al., 2004). Os principais tipos de morte celular são: apoptose, autofagia e necrose tendo cada uma uma característica fenotípica específica e apenas as duas primeiras fazendo parte da MCP. O fenótipo de morte celular dos cinetoplastídeos possui características semelhantes com organismos multicelulares, como vacuolização citoplasmática, condensação da cromatina e a fragmentação do DNA. Essa organela também tem grande importância na MCP, sendo uma das principais organelas utilizadas na literatura para se entender o processo de morte celular induzido por candidatos a fármacos tripanocidas (FIDALGO; GILLE, 2011; PAES et al., 2011).

2.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA DOENÇA DE CHAGAS

Segundo o II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas (DIAS et al., 2016), o diagnóstico na fase aguda deve ser confirmado sempre laboratorialmente, principalmente pelo parasitológico direto, fazendo a detecção da forma tripomastigota sanguínea (padrão-ouro). Paralelo a isso, também é feita a sorologia para detecção de imunoglobulinas M (IgM) anti-*T. cruzi*. Na figura 5, está descrito o fluxograma do diagnóstico laboratorial da doença na fase aguda.

Figura 5 – Fluxograma para diagnóstico laboratorial da doença de Chagas aguda.



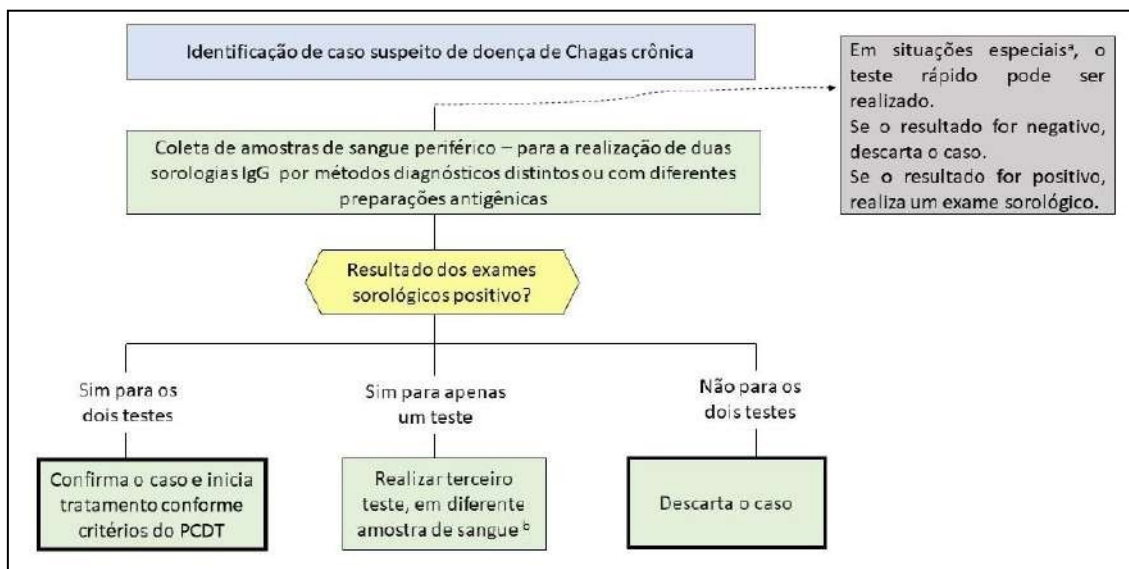
Fonte: Adaptado de Brasil (2018).

Legenda: ^aA confirmação pelo critério sorológico deve ser avaliada rigorosamente, levar em consideração o intervalo entre as datas de início de sintomas e coleta da amostra de sangue, além de considerar evidências clínicas epidemiológicas. ^b Na detecção de IgM, descartar o caso somente após a avaliação da sorologia de imunoglobulina G (IgG). ^c Para confirmação por IgG, são necessárias duas coletas com intervalo mínimo de 15 dias entre uma e outra, sendo preferencialmente execução pareada (inclusão da primeira e da segunda amostras no mesmo ensaio para efeitos comparativos).

Durante a fase crônica da doença, devido à escassez de parasitos no sangue, faz-se necessário outros métodos diagnósticos, como a detecção de imunoglobulinas G (IgG) anti-*T. cruzi* (CHATELAIN, 2015). É preconizado pelo Ministério da Saúde que se utilize pelo menos dois tipos de testes sorológicos diferentes (geralmente ELISA, imunofluorescência indireta e hemaglutinação indireta) para confirmação do diagnóstico

da doença (BRASIL, 2018). Na figura 6 está descrito o fluxograma do diagnóstico laboratorial na fase crônica da doença.

Figura 6 – Fluxograma do diagnóstico laboratorial na fase crônica da doença de Chagas.



Fonte: Brasil (2018).

Legenda: ^a Cenário: sem uma rede laboratorial adequada, investigação diagnóstica em pacientes com difícil acesso aos serviços de saúde e em gestantes com suspeita de doença de Chagas durante o pré-natal ou em trabalho de parto. ^b O terceiro teste realizado pode ser qualquer um dos seguintes: ELISA, imunofluorescência indireta, hemaglutinação indireta, *western blot* ou imunoensaio quimioluminescente.

PCDT = Protocolos Clínicos e Diretrizes Terapêuticas.

Com relação a utilização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para diagnóstico, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2005), essa pode ser uma importante ferramenta no caso de sorologia inconclusiva. Outras utilidades importantes da técnica são a detecção de reativação da doença em imunossuprimidos cronicamente infectados e detecção em pacientes que receberam órgãos de doadores cronicamente infectados (QVARNSTROM et al., 2012).

2.5 FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS

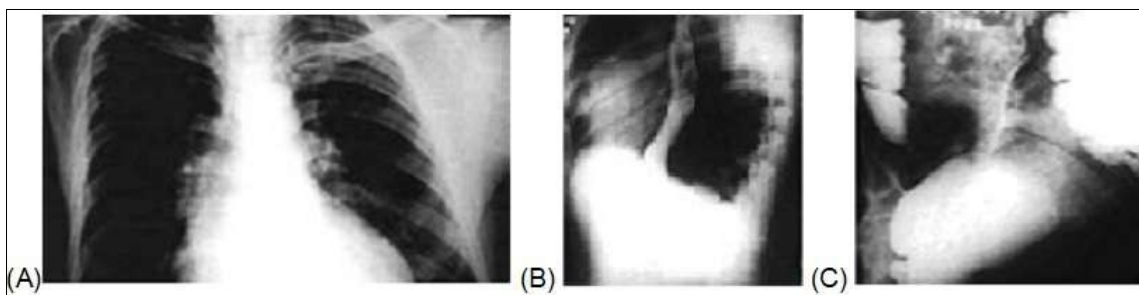
A doença de Chagas possui duas fases: aguda e crônica. A fase aguda pode se apresentar de algumas formas: assintomática, sintomática com sintomas inespecíficos (febre, apatia, hepatoesplenomegalia, etc) ou com um quadro clínico severo que é mais

comum em jovens (TOSO; VIAL; GALANTI, 2011). Durante a fase aguda, a parasitemia e a quantidade de parasitos distribuídos nos tecidos são maiores (DUBNER et al., 2008).

Segundo Tarleton (2001), a fase aguda, com duração de 2 a 3 meses, termina quando o sistema imune consegue controlar a parasitemia e o nível de parasitos nos tecidos. Esse controle envolve anticorpos, linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e linfócitos T CD4+ (auxiliares, resposta do tipo Th1) produtores de altos níveis de IFN- γ (interferon gama).

Após essa fase aguda, cerca de um terço dos pacientes evolui para a fase crônica. Pode haver evolução para a forma indeterminada - sem evidências de comprometimento orgânico - ou para a sintomática (cardíaca, digestiva ou cardio-digestiva) décadas após a infecção inicial (figura 7) (LO PRESTI et al., 2015).

Figura 7 – Radiografias de algumas das apresentações clínicas da doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Coura et al. (2007).

Legenda: (A) Cardiopatia chagásica, (B) megaesôfago grau II e (C) megacólon.

Pessoas com a forma indeterminada possuem sorologia positiva para anticorpos anti-*T. cruzi*, eletrocardiograma normal, e radiologia normal de tórax, esôfago e cólon (RASSI JUNIOR; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Enquanto que, quando se tem a forma digestiva, há alterações na motilidade do esôfago e cólon o que pode acarretar em problemas de deglutição, regurgitação e constipação detalhadas no quadro 1 (TEIXEIRA et al., 2011b).

Quadro 1 – Anormalidades de esôfago e cólon na Doença de Chagas baseadas no raio-x.

Megaesôfago	Megacólon
Diâmetro normal, mas dificuldade em esvaziar o contraste de bário ingerido	Estágio I, com eliminação espontânea das fezes
Dilatação moderada e retenção do contraste de bário	Estágio II, onde não há eliminação espontânea das fezes
Grande dilatação, hipotonia, e contratilidade mínima	Estágio III, com obstrução total
Dilatação muito grande com alongamento do diafragma	

Fonte: Adaptado de Teixeira et al. (2011).

A maioria dos doentes com a forma crônica possui a forma cardíaca, a qual é extremamente debilitante (SOARES; PONTES-DE-CARVALHO; RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2001). Essa forma possui como característica histopatológica principal a inflamação miocárdica, podendo levar ao aumento do coração (megacardíaca), junto com miocitólise e fibrose (MACHADO et al., 2013).

Existem duas vertentes de pensamentos para a patogênese chagásica crônica (GIRONÈS; FRESNO, 2003; TARLETON; ZHANG, 1999). A primeira traz a ideia de que o *T. cruzi* induz uma forte resposta do sistema imune, a qual também atinge os tecidos normais do hospedeiro, o que pode levar à mimetização de epítomos entre parasito/hospedeiro, induzindo autoimunidade (DE BONA et al., 2018; BONNEY; ENGMAN, 2015; TEIXEIRA et al., 2011). A segunda apoia a hipótese de a presença contínua do parasito nos tecidos ser responsável pela inflamação e dano observados nos mesmos (FERNANDES; ANDREWS 2012; TARLETON, 2001; TEIXEIRA; NASCIMENTO; STURM 2006).

Não existe consenso com relação à patogênese da doença de Chagas e há lacunas a serem preenchidas.

2.6 ASPECTOS IMUNOLÓGICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

Embora exista um conflito sobre o mecanismo da patologia da Doença de Chagas, o papel da resposta imune tem sido relatado nas fases aguda e crônica da doença (BOARI et al., 2012; HYLAND et al., 2007; PÉREZ et al., 2012; PONCE et al., 2012; SOARES, PONTES-DE-CARVALHO; RIBEIRO-DOS-SANTOS, 2001).

2.6.1 Infecção aguda

Controlar a infecção pelo *T. cruzi* depende de respostas imunes inatas e adquiridas, que são ativadas durante a infecção inicial e são críticas para a sobrevivência do hospedeiro. Essas respostas envolvem as diferentes células do sistema imunológico e a produção de citocinas do perfil Th1 (pró-inflamatórias). O perfil Th2 está relacionado com a suscetibilidade à doença, onde a principal citocina envolvida é a IL-4 (HIYAMA et al., 2001). Estudos em modelos experimentais agudos da doença mostraram o papel de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF- α (*Tumor necrosis fator alfp α* , Fator de Necrose Tumoral Alfa) e IL-6 na resistência à infecção por *T. cruzi* (ALIBERTI et al., 2001; GAO; PEREIRA, 2002). É importante salientar que IFN- γ e TNF- α têm papel dual de acordo com o curso da doença (FERREIRA et al., 2014; PAPATHANASIOU et al., 2015).

Uma vez que células da resposta imune inata estão diretamente envolvidas no combate a infecção inicial ao *T. cruzi*, é interessante que se entenda a interação de compostos com *toll-like receptors* (receptores *toll-like*, TLRs) visando estimular a capacidade das células dessa resposta imune em responder ao parasito (RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012). Os TLRs são uma família de proteínas transmembrana, evolutivamente conservadas entre insetos e humanos que fazem parte de um grupo de moléculas chamado de *pattern recognition receptors* (receptores de reconhecimento de padrão, PRRs). Ao interagir e reconhecer moléculas chamadas de *pathogen-associated molecular pattern* (padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs) podem induzir resposta imune tanto inata quanto adquirida. Diversas moléculas do parasito têm sido identificadas como PAMPs para os TLRs. Os principais são os glicoinositolfosfolipídeos encontrados em grandes quantidades na membrana celular dos tripanosomatídeos. Estudos têm mostrado que glicosil-fosfaditilinositois (GPIs) derivadas de tripomastigotas são reconhecidas pelo TLR2 (CAMPOS et al., 2001, ROPERT; GAZZINELLI, 2000). Outro GPI purificado das formas epimastigotas induz ativação da via NF- κ B via TLR4 (OLIVEIRA et al., 2004).

A primeira comprovação da importância dos TLRs nos mecanismos de resistência ao *T. cruzi* foi feita em camundongos nocautes para a molécula adaptadora MyD88, essencial para sinalização de quase todos os TLRs. Esses camundongos, quando infectados com tripomastigotas, apresentaram alta parasitemia e mortalidade que estiveram associadas a uma baixa produção de IFN- γ e IL-12 (PELLEGRINI et al., 2011;

GAZZINELLI; DENKERS, 2006). Além disso, camundongos nocaute para TLR4 têm intensa parasitemia, confirmando o papel do TLR4 na resistência a infecção por *T. cruzi* (OLIVEIRA et al., 2004, 2010).

Adicionalmente, camundongos nocautes para TLR2 e TLR9 foram mais suscetíveis à infecção por *T. cruzi* além de ter uma baixa resposta Th1 (BAFICA et al., 2006). Da mesma maneira, a resposta inflamatória induzida pela ligação de glicoinositolfosfolípideo (GIPL) a TLR4 leva à produção de resposta protetora baseada na produção de IFN- γ , TNF- α e ON.

De acordo com estudos anteriores, TLR9 tem um papel crucial no estabelecimento da resposta Th1, enquanto o TLR2 pareceu atuar como um imunorregulador no estágio inicial da infecção. Gravina e colaboradores (2013) investigaram o papel dos TLRs (2 e 9) na infecção aguda experimental por *T. cruzi*. Eles observaram que células dendríticas, macrófagos e monócitos usam de maneiras diferentes esses dois TLRs durante a fase aguda da infecção - levando a produção diferente de TNF- α e IL-12 entre essas células - e que camundongos deficientes de TLR9, e não deficientes de TLR2, são suscetíveis à infecção por *T. cruzi*.

A atuação da resposta imune inata tem importante papel no combate inicial ao parasito. Estudos mostram que macrófagos, células dendríticas e células *natural killer* (NK, assassina natural) desencadeiam forte resposta inflamatória juntamente com aumento da produção de citocinas e quimiocinas (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA et al., 2014; KANIA et al., 2013; MACHADO et al., 2008; PINHO et al., 2014; REZENDE-OLIVEIRA; SARMENTO; RODRIGUES-JUNIOR, 2012).

Após interação inicial do parasito com as células da resposta imune inata, são apresentadas diferentes sinalizações intracelulares que culminam na ativação de NF- κ B, produção de citocinas inflamatórias, conectando a resposta inata à adaptativa para que haja uma resposta imune efetiva (MACHADO et al., 2012). O parasito também pode induzir aumento da produção de IL-12, interferindo na produção de IFN- γ pela ativação de células NK e indução de células da resposta Th1 (KAYAMA; TAKEDA, 2010). Além disso, essas células NK ativadas por IL-12 levam à expansão de células TCD4⁺ e CD8⁺ pela produção de IFN- γ , as quais produzem mais IFN- γ . Esse último, juntamente com TNF- α e IL-12, ativa macrófagos que estão infectados com *T. cruzi* a produzir óxido nítrico (ON) e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) controlando a divisão intracelular do parasito e promovendo sua eliminação (DAFF, 2010; DOS-SANTOS et al., 2016; GUPTA; WEN; GARG, 2009; GUTIERREZ et al., 2009; SILVA;

MACHADO; MARTINS, 2003). No entanto, ON em excesso também pode levar a danos teciduais, mostrando o seu papel dual e a importância do controle imunológico (TATAKIHARA et al., 2015). O TNF- α também atua por via autócrina sendo um segundo sinal que leva à produção de ON por macrófagos ativados por IFN- γ e miócitos cardíacos infectados (MACHADO et al., 2000). Com isso, tanto o ON quanto a enzima iNOS são considerados importantes alvos imunomoduladores a serem investigados (SERAFIM et al., 2012).

Além da resposta imune inata, a resposta imune adaptativa é de extrema importância e vem sendo elucidada (BASSO, 2013; PADILLA; BUSTAMANTE; TARLETON, 2009). Um estudo mostrou miocardite relacionada à presença de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ na fase aguda da doença, bem como de antígenos de *T. cruzi* (MENEZES et al., 2004), ou seja, essas células podem estar envolvidas na patologia da miocardite aguda. Linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ secretam principalmente IFN- γ , o principal responsável pela polarização Th1 em relação a Th2. Já os linfócitos T CD8⁺ são apontados em processos distintos, tanto durante a progressão da doença, na patologia na fase crônica (DUTRA et al., 2000), como no controle de parasitos na infecção aguda (COSTA et al., 2000), e também associados a uma possível ausência de atividade que ajuda no estabelecimento da doença (ALBAREDA et al., 2006). Uma das citocinas que influenciam nesses mecanismos efetores dos linfócitos T CD8⁺ e na expansão dos linfócitos T na infecção aguda é a IL-2 (MARTIN; TARLETON, 2004). Devido a essa gama de influências descritas para essas células, especula-se que populações distintas de células T CD8⁺ podem existir durante a doença, relacionadas às diferentes funções (MACHADO et al., 2012). Além da dicotomia Th1/Th2, células Th17 também demonstraram ajudar no controle da infecção e da inflamação cardíaca na fase aguda em modelo experimental da doença, modulando a resposta Th1 (GUEDES et al., 2010).

Apesar de toda essa resposta imune desenvolvida para que haja o combate ao parasito, muitos pacientes evoluem da forma aguda para a forma crônica da doença. Alguns dos fatores envolvidos nessa evolução são a evasão de *T. cruzi* ao sistema imune, a cepa envolvida na infecção inicial e o a capacidade do sistema imune do hospedeiro em responder a essa infecção (MAGALHÃES et al., 2015; NAGAJYOTHI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2010).

Com relação ao escape ao sistema imune, uma das maneiras que o parasito possui para fazê-lo é bloqueando a ativação de NF- κ B, o que leva à menor produção da citocina pró-inflamatória IL-12 por macrófagos, através da ação da enzima parasitária cruzaina

(DOYLE et al., 2011). Outra molécula do parasito que interage com o sistema imune e o modula é a enzima *trans*-sialidase, a qual é considerada um fato de virulência parasitária devido a isso. Durante a apresentação de antígeno, a *trans*-sialidase limita a resposta pró-inflamatória e estimula a resposta anti-inflamatória através de uma maior produção de IL-10, favorecendo a infecção e persistência do parasito nos tecidos (DÍAZ et al., 2015). O parasito também expressa em sua superfície moléculas semelhantes à mucina que participam da interação inicial parasito-hospedeiro, bem como da evasão ao sistema imune (NARDY; FREIRE-DE-LIMA; MORROT, 2015). A forma sialilada dessas proteínas protege o parasito da ação de anticorpos, do sistema complemento (DA FONSECA et al., 2019), além de impedir os eventos iniciais de ativação de linfócitos T (ALCAIDE; FRESNO, 2004).

Outro fator que está envolvido na infecção inicial é a cepa do parasito. Um estudo com duas cepas de dois *Discrete Typing Units* (DTUs) diferentes (TcI e TcII) na infecção aguda demonstrou que a cepa Col cl1.7, pertencente a TcI, levou a uma maior ativação de monócitos e produção de IL-10, enquanto que a cepa Y, pertencente a TcII, ativa menos os monócitos, no entanto, causa uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias por células periféricas mononucleares (MAGALHÃES et al., 2015). DTU é um conjunto de unidades populacionais geneticamente mais semelhantes entre si do que a qualquer outra unidade e podem ser identificados por marcadores genéticos/moleculares/imunológicos comuns (TIBAYRENC, 2003). Ou seja, as cepas podem levar a desfechos imunológicos diversos e, conseqüentemente, a impactos diferentes no curso clínico da doença.

2.6.2 Infecção crônica

Na fase crônica da doença de Chagas, os sinais e sintomas clínicos dos pacientes, ou a ausência, parecem estar relacionados com a resposta imunológica do indivíduo. Sabe-se que na forma cardíaca há um perfil Th1 de citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-6, IL-9, IL-12) com baixo nível de citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), enquanto o contrário é visto na forma indeterminada, sugerindo que o equilíbrio destas citocinas poderia ter um papel-chave no desenvolvimento da doença (DUTRA et al., 2009; POVEDA et al., 2014). Em meio a esse ambiente de regulação, há o envolvimento de outras células do sistema imune, como monócitos/macrófagos, influenciando a

atividade linfocitária tanto em modelos experimentais quanto em humanos na fase crônica (DHIMAN et al., 2013; GOMES et al., 2014).

Duas das principais citocinas do perfil pró-inflamatório, TNF- α e IFN- γ , estão diretamente envolvidas na patologia da forma cardíaca da Doença de Chagas (CRIADO et al., 2012; PEREIRA et al., 2014; RODRIGUES et al., 2012; TORZEWSKI et al., 2012). Além delas, IL-6 foi uma citocina muito expressa por pacientes com essa forma em estudo de Sousa et al. (2014), em relação a pacientes com a forma indeterminada, que expressaram IL-10 em maior quantidade. Assim, a resposta imunológica do tipo 1, embora importante na contenção da replicação parasitária durante a fase aguda como já descrito, pode também estar envolvida no desenvolvimento de doença cardíaca grave (ABEL et al., 2001).

Em relação a forma indeterminada, há um aumento da expressão de citocinas e fatores de transcrição relacionados aos perfis Th2, Th9, Th22 e Treg, associado há uma expressão reduzida das citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α (GUEDES et al., 2016; SOUZA et al., 2017). Estudos indicam uma correlação entre a produção de citocinas inflamatórias por células T CD4⁺ e monócitos de pacientes com a forma cardíaca e a produção de IL-10 pelas mesmas células de pacientes assintomáticos (SOUZA et al., 2004, 2007). Isso indica que as citocinas anti-inflamatórias podem ajudar a neutralizar a ação das citocinas pró-inflamatórias e consequentemente podem levar a redução dos danos teciduais (GOMES et al., 2003; VILLANI et al., 2010).

Enfatizando a relevância da regulação do sistema imune, as células T reguladoras são majoritariamente encontradas em pacientes com a forma indeterminada da doença e as principais envolvidas na produção de IL-10, mostrando a importância das células produtoras dessa citocina na regulação da resposta imunológica desses pacientes (ARAÚJO et al., 2006, 2011a, 2011b, 2012; LIU; ZHAO, 2007). Uma outra evidência da importância dessas células no controle da patologia é a de que pessoas com a forma indeterminada possuem maior número de células T CD4⁺CD25^{high}, levando a crer que a expansão dessas células pode ser benéfica na fase crônica (VITELLI-AVELAR et al., 2005). Aliado a isso, estudo de Guedes et al. (2012) com pacientes com a forma cardíaca, mostrou uma maior produção de IL-10 e IL-17 na forma mais branda da doença e que diminuição da função de células T CD4⁺CD25⁺ e menores níveis de IL-17 têm ligação com a forma mais severa. Um estudo de Magalhães et al. (2012) corroborou com esses achados, além de verificar que na forma cardíaca há um menor número de células Th17 circulantes, em relação a pacientes indeterminados e não infectados. Além disso, estudo

de Cai et al. (2016) em modelo experimental da doença trouxe que células Th17 são mais protetivas frente à infecção por *T. cruzi* que células Th1, além de mostrar que essas células podem agir tanto na imunidade extracelular como na intracelular.

Muito vem se discutindo sobre o benefício do tratamento na fase crônica (VIOTTI et al., 2014; SOSA-ESTANI; COLANTONIO; SEGURA, 2012), principalmente levando em consideração manifestações clínicas, sorologia e a parasitemia (AGUIAR et al., 2012; ÁLVAREZ et al., 2012; ANDRADE et al., 2013; FRAGATA-FILHO et al., 2016). Porém, pouco se investiga sobre a influência do tratamento no sistema imune. A presença de altos níveis de IFN- γ em células mononucleadas do sangue periférico de pacientes curados após tratamento sugere um efeito benéfico dessa citocina na eficácia da quimioterapia (BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000). No entanto, o envolvimento desta citocina juntamente com eventos citotóxicos no desenvolvimento da doença também tem sido descrito (SOARES et al., 2001). Ou seja, durante a fase aguda da infecção, IFN- γ pode agir em sinergia com o tratamento específico para eliminar os parasitos (FERRAZ et al., 2007; ROMANHA et al., 2002). Essa relação benéfica entre o balanço de citocinas e tratamento também foi vista na fase crônica em pacientes com a forma indeterminada e cardíaca (SATHLER-AVELAR et al., 2006, 2008, 2012).

Na forma indeterminada, o tratamento com benzonidazol levou a uma indução do perfil pró-inflamatório por células NK e T CD8⁺ junto com manutenção de IL-10, enfatizando a relevância do ambiente regulatório, já na forma cardíaca levou a menores níveis de IFN- γ e maiores níveis de IL-10 (CAMPI-AZEVEDO et al., 2015). Um estudo conduzido por Mateus e colaboradores (2017) com indivíduos cronicamente infectados, mostrou que o tratamento com o benzonidazol melhorou a resposta T CD8⁺ antígeno-específica, diminuindo a coexpressão de moléculas inibitórias dessas células e aumentando a capacidade funcional dessas células (observado pelo aumento produção de citocinas e moléculas citotóxicas). Alinhado a isto, estudo de Pérez-Antón e colaboradores (2018) concluiu que o tratamento com o benzonidazol em pessoas cronicamente infectadas reverteu o processo de exaustão das células T CD4⁺ e CD8⁺ e aumentou a capacidade responsiva desses linfócitos (aumento de células expressando IL-2 e TNF- α). Este processo de exaustão de linfócitos T tem sido relatado na literatura. Ele ocorre devido a uma exposição contínua a antígenos parasitários, desencadeando uma resposta disfuncional dos linfócitos T através da diminuição da capacidade de produzir citocinas e moléculas citotóxicas contra o agente infeccioso, além de induzir aumento progressivo

na expressão e coexpressão de moléculas inibitórias na membrana das células T específicas para o antígeno (RODRIGUES et al., 2014).

Não se sabe o que leva a um aumento do perfil anti-inflamatório observado na forma indeterminada em relação a um perfil pró-inflamatório observado na forma cardíaca. Isso pode depender das características genéticas do hospedeiro e das alterações dependentes da idade do sistema imunológico, por exemplo (AYO et al., 2013; DRIGO et al., 2006; FRADE et al., 2013; HENAO-MARTÍNEZ; SCHWARTZ; YANG, 2012; NOGUEIRA et al., 2015; PISSETI et al., 2013).

Por um lado, a gama de perfis imunológicos envolvidos na patologia da doença reforçam a importância de investigar como um possível novo tratamento pode atuar no sistema imunológico, auxiliando no combate ao desenvolvimento da doença. Por outro lado, esse aspecto imunológico é pouco investigado quando se trata de novos medicamentos para a doença.

Uma variedade de classes de compostos tem sido testada para a doença de Chagas e algumas estruturas privilegiadas, especialmente aquelas relacionadas à ftalimida, tiossemicarbazonas, tiazóis e 4-tiazolidinonas estão sendo consideradas chassis moleculares (*scaffolds*) anti-*T. cruzi* e imunomoduladores promissores (LEITE et al., 2019). Gomes e colaboradores (2020) testaram tanto ftalimido-tiossemicarbazonas quanto derivados de ftalimido-tiazol *in vitro* e encontraram 3 compostos com IC₅₀ abaixo de 5 µM frente a tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Em um trabalho que testou derivados de tiossemicarbazonas, o composto [(E)-2-(1-(4-clorofeniltio)propano-2-ilideno)hidrazinacarbotioamida] (C3) apresentou anticorpos anti-*T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*, além de diminuir a liberação de tripomastigotas dos cardiomiócitos sem depender da produção de ON, TNF-α e IL-6 (DE ASSIS et al., 2021). Álvarez e colaboradores (2015) sintetizaram e testaram derivados de tiazol e foi possível encontrar uma molécula que diminui o infiltrado inflamatório mononuclear no coração de camundongos infectados com *T. cruzi*. Dois dos derivados de cloro de 4-tiazolidinonas testados contra *T. cruzi*, os compostos 2-[1-(2,5-diclorofenil)etilidenohidrazona]-5-etiltiazolidina-4-ona e 2-[1-(2,4-diclorofenil)etilidenohidrazona]tiazolidina-4-ona (2c e 3a), mostraram atividade antiparasitária independente da liberação de ON (DE OLIVEIRA-FILHO, 2021).

Devido a essa gama de perfis imunológicos envolvidos na patologia da doença, existe a importância de se investigar de que maneira um possível novo tratamento pode agir no sistema imunológico, auxiliando a combater o desenvolvimento da doença.

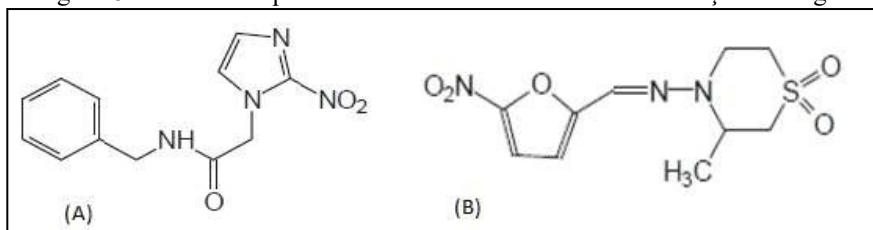
Percebe-se que a imunoterapia e o desenvolvimento de compostos imunomoduladores, apesar de pouco explorada, é uma importante abordagem para a doença de Chagas (DARANI et al., 2016).

2.7 TRATAMENTO DA DOENÇA DE CHAGAS: ENSAIOS CLÍNICOS E CLASSES PROMISSORAS

Desde a sua descoberta em 1909, diversos compostos foram testados para o tratamento da doença, entre eles: arsênicos, fucsina, bismuto, anti-histamínicos, anfotericina B, antibióticos, entre outros (COURA; DE CASTRO, 2002).

O tratamento atualmente é baseado em dois medicamentos (figura 8): o benzonidazol (produzido pelo LAFEPE como Benznidazol LAFEPE® no Brasil e pela Maprimed/ELEA na Argentina como Abarax®) e o Nifurtimox (Lampit™, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemanha); porém, eles são mais efetivos na fase aguda da doença em detrimento da fase crônica, além de possuírem uma alta toxicidade (MORILLA; ROMERO, 2015). Mais especificamente, a eficácia de cura na fase aguda é de 50-80%, enquanto na fase crônica é de 8-20% (SALES-JUNIOR et al., 2017).

Figura 8 – Estruturas químicas dos fármacos utilizados na doença de Chagas.



Fonte: Bosquesi et al. (2008).

Legenda: (A) Benzonidazol e (B) Nifurtimox.

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2016), os efeitos adversos gerados pela grande toxicidade do tratamento são principalmente gastrointestinais como vômito, dor abdominal, anorexia e perda de peso, no caso do nifurtimox e dermatite alérgica, insônia e neuropatia periférica no caso do benzonidazol. Nenhuma droga foi aprovada para o tratamento da doença nos últimos 50 anos desde o descobrimento do benzonidazol e do nifurtimox (BELLERA et al., 2015).

Segundo a *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas, DNDi, 2015), o tratamento atual possui problemas como

longa duração (30-60 dias), toxicidade dose-dependente, baixa taxa de adesão. Recentemente foi lançada, com o apoio do DNDi, uma formulação para ser utilizada em crianças abaixo de 2 anos produzida pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE) e registrada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Algumas das vantagens vinculadas a essa formulação são: mais segurança no tratamento dessa faixa etária; comprimido facilmente dispersível em líquidos, o que facilita a administração; necessidade de fracionamento apenas em casos especiais (crianças prematuras com menos de 2,5kg de peso); e o fato da administração do medicamento poder ser feita em casa de forma segura durante todo o tempo do tratamento (duas vezes ao dia por 60 dias).

De acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (Centro de Controle e Prevenção de Doença, CDC, 2016), o tratamento é indicado para todas as pessoas com infecção aguda, infecção congênita, imunossuprimidos e crianças com a forma crônica da doença (quadro 2).

Quadro 2 – Esquema terapêutico para a doença de Chagas.

Medicamento	Faixa etária	Dose e duração
Benzonidazol	< 12 anos	5-7,5 mg/kg/dia, via oral, duas vezes ao dia por 60 dias
	12 anos ou mais	5-7 mg/kg/dia, via oral, duas vezes ao dia por 60 dias
Nifurtimox	≤ 10 anos	15-20 mg/kg/dia, via oral, 3 a 4 vezes ao dia por 90 dias
	11-16 anos	12,5-15 mg/kg/dia, via oral, 3 a 4 vezes ao dia por 90 dias
	17 anos ou mais	8-10 mg/kg/dia, via oral, 3 a 4 vezes ao dia por 90 dias

Fonte: Adaptado de *Centers for Disease Control and Prevention* (2016).

Um outro problema relativo ao tratamento da doença é o acesso à medicação. De acordo com o Médicos Sem Fronteiras, alguns países como Bolívia e Paraguai passaram por períodos sem aquisição do medicamento, prejudicando o tratamento (MÉDICOS SEM FRONTEIRAS, 2011). Alguns países de áreas não-endêmicas como Espanha também reportaram a escassez do medicamento (NAVARRO et al., 2012). Essa ausência foi devida principalmente ao aumento da demanda pelo medicamento que não foi acompanhado pelo aumento da produção (CHAAR, 2014). Isso demonstra a necessidade de planejamento para o manejo do tratamento dessa doença que é e atualmente sofre com negligência. Além disso, estudos clínicos de novos tratamentos para essa doença são

longos e há problemas relativos ao diagnóstico, como a falta de ferramentas que demonstrem a cura parasitológica na fase crônica, dentre outros (URBINA, 2015).

Um outro aspecto importante e que deve ser levado em consideração na busca de novas terapias pra doença de Chagas é o surgimento de cepas resistentes ao tratamento atual (FAIRLAMB et al., 2016). Para que esse obstáculo seja superado, a principal estratégia empregada é a combinação de medicamentos (SALOMÃO; DE CASTRO, 2017).

Recentemente foi descrita uma forma dormente de *T. cruzi*. Estas são formas amastigotas não-replicativas, capazes de restabelecer a infecção após até 30 dias da exposição ao tratamento com o benzonidazol (SÁNCHEZ-VALDÉZ et al., 2018). Estas formas evolutivas podem ajudar a explicar a variabilidade na eficácia dos tratamentos atuais, que normalmente são altamente eficazes na diminuição da parasitemia; no entanto, têm taxas variáveis de soroconversão e conversão para PCR negativa (KRATZ et al., 2018)

O tratamento da doença na fase crônica não possuía consenso sobre sua eficácia, tanto em modelos experimentais da doença quanto em estudos com pacientes crônicos (MARIN-NETO et al., 2009). No quadro 3 estão alguns dos ensaios clínicos com fármacos para a doença de Chagas.

Quadro 3 – Ensaios clínicos com fármacos para a doença de Chagas.

Ensaio clínico	Objetivo
BENEFIT	Verificar a eficácia do tratamento com benzonidazol em prevenir a progressão da cardiopatia chagásica crônica e a morte dos pacientes.
BENDITA	Encontrar novas dosagens do tratamento atual sem diminuir sua eficácia, além de testar o benzonidazol associado ao fosravuconazol, um antifúngico de amplo espectro.
Estudo de prova de conceito do E1224 para tratar pacientes adultos com doença de Chagas	Determinar se cada um dos três diferentes regimes de dosagem de E1224 é eficaz e seguro na erradicação da parasitemia por <i>T. cruzi</i> em indivíduos com a forma crônica indeterminada da DC, em comparação ao placebo.
CHAGASAZOL	Avaliar a eficácia e segurança do posaconazol em comparação com a eficácia e segurança do benzonidazol em adultos com infecção crônica pelo <i>T. cruzi</i> .
TESEO	Comparar a segurança e a eficácia de dois novos regimes de quimioterapia de benzonidazol e nifurtimox em adultos com a doença de chagas crônica com o tratamento padrão atual.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Um grande recente estudo multicêntrico e randomizado com doentes chagásicos foi desenvolvido por pesquisadores de diversos países (Brasil, Colômbia, El Salvador, Argentina e Bolívia). Esse estudo, denominado *Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis* (BENEFIT, Avaliação do Benzonidazol para Interrupção da

Tripanossomíase), buscava verificar a eficácia do tratamento com benzonidazol em prevenir a progressão da cardiopatia chagásica crônica e a morte dos pacientes, acompanhando 2.854 indivíduos por cerca de 5 anos. Ele trouxe grande avanço com relação ao entendimento do efeito do tratamento com o benzonidazol nesses pacientes. Embora o estudo tenha mostrado diminuição da detecção parasitária no soro, não verificou diminuição da cardiopatia nos pacientes tratados (MORILLO et al., 2015).

Outro estudo clínico com pacientes com doença de Chagas é o estudo *Benznidazole New Doses Improved Treatment & Therapeutic Associations* (BENDITA, Novas Doses de Benzonidazol Melhoraram o Tratamento & Associações Terapêuticas). O objetivo deste estudo foi encontrar novas dosagens do tratamento atual sem diminuir sua eficácia, além de testar benzonidazol associado ao fosravuconazol, um medicamento antifúngico de amplo espectro (DNDi, 2019). Em parte desse estudo concluído, foi descoberto que o tratamento de 2 semanas é promissor, pois é 4 vezes mais curto que o tratamento padrão. No entanto, os dados dos tratamentos combinados (benznidazol combinado com fosravuconazol) ainda estão sendo analisados. Essa dosagem e tempo de tratamento mais baixos facilitariam a adesão ao tratamento, uma vez que reduziriam consequentemente os efeitos adversos.

Um outro grande estudo randomizado, duplo-cego, de fase clínica 2, que pesquisou a atividade do E1224 - um pró-fármaco do ravuconazol solúvel em água - foi recentemente concluído. O estudo concluiu que o E1224 tem um efeito supressor transitório na eliminação do parasito, enquanto o benzonidazol mostrou eficácia precoce e que se manteve por 12 meses de acompanhamento (TORRICO et al., 2018).

Visando avaliar a eficácia, segurança e perfil de efeitos adversos do posaconazol, foi desenvolvido o estudo clínico prospectivo e randomizado denominado CHAGASAZOL. No entanto, significativamente mais pacientes nos grupos tratados com o posaconazol do que no grupo tratado com o benzonidazol tiveram falha no tratamento durante o estudo (MOLINA et al., 2014).

Um estudo mais recente, o *New Therapies and Biomarkers for Chagas infection* (TESEO) visa comparar a segurança e eficácia de dois novos regimes de quimioterapia de benzonidazol e nifurtimox em adultos com a doença de chagas crônica com o tratamento padrão atual, avaliados por PCR em tempo real e biomarcadores por 36 meses pós-tratamento e correlacionados com a sorologia convencional da doença de Chagas. (ALONSO-VEGA, 2021) Esse ensaio clínico ainda está em desenvolvimento.

Levando-se em consideração esses aspectos, fica clara a necessidade de se continuar buscando um novo tratamento para a doença, que seja menos tóxico, de fácil acesso, de curta duração e igualmente eficaz entre as fases da doença.

2.8 DESAFIOS NO ESTUDO DE DROGAS PARA A DOENÇA DE CHAGAS

Um dos grandes desafios no tratamento dessa enfermidade é a descoberta de fármacos mais eficazes e menos tóxicos. Porém, o desenvolvimento de um composto eficaz esbarra em alguns obstáculos, como a dificuldade de padronização de testes *in vivo* e *in vitro* para o *screening* dos compostos e a ausência de marcadores de eficácia do tratamento e de critérios de cura (PINAZO et al., 2014; ROMANHA et al., 2010).

Estudos desenvolvidos por Chatelain e Konar (2015) trazem diversas questões que precisam ser respondidas sobre experimentação em pesquisa de drogas para a doença de Chagas (quadro 4):

Quadro 4 – Questões que permanecem sem respostas na doença de Chagas.

Modelos de doença	Desenho do experimento (eficácia final, comparadores, esquemas de tratamento)
Como a variabilidade observada em diferentes modelos animais poderia ser diminuída?	Qual é a importância do tempo de início do tratamento, regime de dosagem e duração do tratamento?
A eficácia de um composto em um modelo agudo validado pode ser aplicada com sucesso em um modelo crônico da doença?	Como se definiria cura em um modelo de escolha?
Modelos de doença crônica envolvendo cepas de <i>T. cruzi</i> menos suscetíveis ao benzonidazol são melhores?	Quais seriam os melhores compostos ou controles utilizados para comparação que deveriam ser usados em modelos animais selecionados para validar os testes dos compostos e extrapolar para o homem?
A avaliação <i>in vitro</i> da eficácia de um composto contra um painel de cepas representativas do parasito pode ser uma substituta para testes <i>in vivo</i> em modelos animais com as mesmas cepas?	-

Fonte: Adaptado de Chatelain e Konar (2015).

Com relação ao tratamento da doença, o DNDi (2016) traz critérios considerados aceitáveis e ideais para o tratamento da doença, expostos no quadro 5.

Quadro 5 – Critérios aceitáveis e ideais, segundo o DNDi, para o tratamento da doença de Chagas.

	Aceitável	Ideal
População alvo	Doentes crônicos	Doentes agudos e crônicos
Cepas de <i>T. cruzi</i>	TcI, TcII, TcV e TcVI	Todas
Adulto/Criança	Adulto	Todos
Distribuição	Todas as áreas	Todas as áreas
Eficácia clínica	Não inferior a benzonidazol em todas as regiões endêmicas (parasitológico)	Superior ao benzonidazol nas diferentes fases da doença (parasitológicos)
Atividade contra cepa resistente	Desnecessária	Com atividade contra cepas resistentes a nitrofurazol e a nitroimidazol
Contraindicações	Gravidez/Lactação	Nenhuma
Precauções	Não genotóxico, com potencial pró-arritmico insignificante	Sem genotoxicidade; sem teratogenicidade; sem efeito inotrópico negativo; potencial pró-arritmico significativo
Interações	Nenhuma interação clinicamente significativa com medicamentos anti-hipertensivos, antiarritmico e anticoagulantes	Nenhuma
Apresentação	Via oral	Via oral
Regime de dosagem	Comparável ao tratamento sistêmico com antifúngicos	Uma vez ao dia durante 30 dias

Fonte: Adaptado de *Drugs for Neglected Diseases Initiative* (2016).

Em 2009, o DNDi aproveitou o ano do centenário da descoberta da doença de Chagas para lançar a “Plataforma de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas”. A plataforma é uma rede que tem como objetivo a pesquisa e o desenvolvimento de um novo tratamento para a doença. Essa mesma organização tem promovido encontros para desenvolvimento e debate de *Target Product Profile* (TPP, Perfil do Produto-Alvo) para a Doença de Chagas. Porrás et al. (2015) expõem TPPs relativos tanto ao diagnóstico, quanto ao tratamento da doença, demonstrando a importância do debate dos mesmos.

Ensaios *in vitro* aprimorados, os quais incluem painéis de cepas de *T. cruzi* e isolados clínicos (cobrindo todas DTUs atuais), bem como ensaios que avaliam a eliminação total do parasito atualmente fazem parte das cascatas de triagem utilizadas

para priorizar apenas os compostos mais promissores a progredirem para experimentos *in vivo* (CAL et al., 2016; CHATELAIN; IOSET, 2018; FRANCISCO et al., 2017; MACLEAN et al., 2018; ZINGALES, 2018).

Nesse contexto, fica claro que há algumas dificuldades a se superar para que haja a descoberta de um tratamento adequado para a doença.

2.9 MÉTODOS COMPUTACIONAIS E O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

A importância de estudos *in silico* (computacionais) vem sendo percebida e bem aceita pela comunidade científica e pela grande indústria farmacêutica. Estima-se que o uso destas metodologias pode reduzir os custos e o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco em até 50% (GELDENHUYS et al., 2006). Isto ocorre porque muitas vezes o número de moléculas que precisam ser sintetizadas e testadas passa a ser drasticamente reduzido pela alta capacidade de predição e confiabilidade dos testes *in silico*, diminuindo o tempo de desenvolvimento de um novo fármaco.

Os testes computacionais empregados no desenvolvimento de novos compostos podem ser subdivididos em duas categorias: baseados na estrutura do ligante ou do alvo (LEELANANDA; LINDERT, 2016). Uma das metodologias *in silico* baseadas na estrutura do alvo mais utilizadas é o *docking* molecular (FERREIRA et al., 2015). O *docking* determina se há interação energética favorável entre duas moléculas (ligante e alvo biológico) com o objetivo de compreender as razões moleculares responsáveis pela potência farmacológica destes ligantes ou fármacos em potencial (GUEDES; DE MAGALHÃES; DARDENNE, 2014). O alvo utilizado deve ter um papel biológico importante na condição que está sendo estudada, em que a modulação da sua atividade pela molécula leve a alteração na via onde esteja envolvido (OVERINGTON; ALLAZIKANI; HOPKINS, 2006; SOUSA et al., 2010). Na maioria das vezes, esses alvos são proteínas. Uma vez que o sistema imune está envolvido em diferentes patologias e condições, o *docking* também vem sendo empregado no contexto de interação com o sistema imune para que seja avaliados possíveis alvos imunológicos e como esses alvos podem ser modulados pelos compostos (MESAIK et al., 2006; SHRIVASTAVA et al., 2016).

Dentro deste campo de pesquisa, há diferentes formas de aplicabilidade de ferramentas computacionais, afinal não apenas a predição de interação com alvos

diretamente causadores de doenças é importante. Atualmente, existem diferentes bancos de dados de predição de alvos tanto de toxicidade, quanto de farmacocinética e farmacodinâmica (MALTAROLLO et al., 2015; RAIES; BAJIC, 2016). Esses são tópicos importantes a serem investigados, pois têm ligação direta com o sucesso terapêutico, além de serem grandes fatores de perdas no desenvolvimento de fármacos (WARING et al., 2015).

Um desses bancos de dados, é a plataforma Protox-II. Esta plataforma compara as estruturas bidimensionais das moléculas de interesse com aquelas que estão depositadas na plataforma (e que possuem dados de toxicidade bem descritos), utilizando de *machine learning* e modelos matemáticos para a predição de diferentes desfechos e alvos de toxicidade (DRWAL et al., 2014). Um outro exemplo de plataforma que auxilia na busca por alvos biológicos é a *Similarity ensemble approach* (SEA). Da mesma maneira que a Protox-II, ela utiliza de semelhanças estruturais entre os ligantes para sugerir possíveis alvos (KEISER et al., 2007). Uma importante ferramenta de predição de farmacocinética é a *SwissADME*, que tem o mesmo princípio das plataformas já mencionadas, e nos fornece informações como: solubilidade em água; lipofilicidade; absorção por algumas barreiras como pele, trato gastrointestinal (TGI) e barreira hematoencefálica (BHE), parâmetros de semelhança à fármacos, entre outros (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017).

Com isso, é importante que se alie e relacione métodos computacionais e ensaios biológicos a fim de que haja uma melhor predição de atividade de novos compostos, diminuindo assim as perdas no desenvolvimento de novos medicamentos.

2.10 ALVOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* COM IMPORTÂNCIA NO DESENVOLVIMENTO DE NOVOS COMPOSTOS PARA DOENÇA DE CHAGAS

Um dos enfoques das pesquisas em relação à doença de Chagas tem sido o desenvolvimento de medidas eficazes para seu controle (BONNEY, 2014). Uma dessas medidas é a pesquisa por novos fármacos para o tratamento da doença, que tem crescido sensivelmente nos últimos anos (BUCKNER; NAVABI, 2010).

Para que os estudos avancem, é importante que se busque alvos moleculares específicos para o parasito (GILBERT, 2013). Field e colaboradores (2017) descrevem alguns importantes critérios para seleção dos alvos, os quais estão descritos no quadro 6.

Quadro 6 – Critérios propostos para a seleção de alvos.

Descrição do critério
Validação genética e química do alvo
Se o alvo pode ser inibido por moléculas semelhantes a fármacos
Se é possível estabelecer um teste de alto rendimento (<i>high throughput-assay</i>) com ele
Qual o potencial de resistência que pode surgir contra esse alvo
A capacidade de toxicidade devido a inibição de alvos homólogos a ele em humanos
A disponibilidade de informações sobre a estrutura do alvo

Fonte: Adaptado de Field et al. (2017).

Várias moléculas vêm sendo exploradas em programas de química medicinal com a aplicação de métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor e na estrutura do ligante (VERMELHO; RODRIGUES; SUPURAN, 2019). Alvos importantes de *T. cruzi* dentro da busca por novas abordagens terapêuticas para a doença de Chagas são principalmente enzimas como trans-sialidase, nitrorredutase tipo 1 (NTR), esqualeno sintase (ES), 14-alfa demetilase (CYP51), tripanotiona redutase (TR) e a cruzaina (BERMUDEZ et al., 2016; CRISTOVÃO-SILVA et al., 2019; SAN FRANCISCO et al., 2017; SCARIM et al., 2018; VILLALTA; RACHAKONDA, 2019).

2.10.1 Trans-sialidase

A trans-sialidase é uma enzima ausente em células de mamíferos e envolvida na evasão do parasito ao sistema imune, mais especificamente ao sistema complemento, bem como na adesão e invasão às células do hospedeiro (RUBIN-DE-CELIS et al., 2006; RUBIN-DE-CELIS; SCHENKMAN, 2012). No estudo de Campo et al. (2012) foram investigados neoglicoconjugados sialilmiméticos, onde o composto 1,2,3-triazol conjugado ao ácido siálico-6-O-galactose se destacou com relação a sua atividade. A conjugação de análogos do lactitol com polietileno glicol também se mostrou eficaz em inibir a enzima em estudos *in vitro* (GIORGI et al., 2012). Mais recentemente, uma triagem em base de dados com mais de 4 milhões de compostos encontrou duas moléculas, ZINC13359679 e ZINC02576132, como candidatos mais promissores a inibidores dessa enzima (MILLER; ROITBERG, 2013).

2.10.2 Nitrorredutase tipo 1 (NTR)

A NTR é uma enzima envolvida na ativação de compostos nitro-heterocíclicos, como o Benzonidazol e o Nifurtimox utilizados no tratamento da doença de Chagas

(WILKINSON et al., 2008). Estudos recentes mostraram o potencial tanto *in vitro* quanto *in vivo*, incluindo estudos de absorção, distribuição, metabolismo, excreção (ADME), de inibidores dessa enzima (PAPADOPOULOU et al., 2013, 2015, 2016). Corroborando com essa ideia, o estudo de Moraes et al. (2014) demonstrou que inibidores da NTR se mostraram mais efetivos que inibidores da síntese de ergosterol em testes utilizando amastigotas de representantes de cada DTU.

2.10.3 Enzimas envolvidas na síntese do ergosterol

As enzimas esqualeno sintase (ES), lanosterol 14 α -desmetilase (CYP51), esqualeno epoxidase, oxidosqualeno ciclase e esterol 24-C-metiltransferase são as principais enzimas pesquisadas para que haja inibição na via do ergosterol (VILLALTA; RACHAKONDA, 2019). Nesta revisão, focaremos nas duas primeiras.

O ergosterol é um esterol de membrana essencial em muitos tripanossomatídeos e tem o mesmo papel estrutural que o colesterol em humanos. Leveduras e fungos também produzem necessitam do ergosterol e o produzem e os fármacos azólicos foram originalmente desenvolvidos como antifúngicos (SANT et al., 2016), mas posteriormente foram relatados como tendo atividade potente contra *T. cruzi*. Desde então tem sido desenvolvido esforços para o reposicionamento destes fármacos para a doença de Chagas (RIVERO; ROMANO, 2016; REIGADA et al., 2019).

A enzima ES é responsável por catalisar o primeiro passo para a biossíntese de esteróis, quem consiste em condensar duas moléculas de difosfato de farnesil para produzir esqualeno. Essa enzima foi primeiro citada como um potencial alvo para a doença por Urbina e colaboradores (2002). Desde então, alguns inibidores desta enzima vêm sendo relatados como promissores para a doença de Chagas. O composto WC-9, inicialmente planejado por Urbina e colaboradores (2003), é o inibidor desse alvo mais promissor, o qual demonstrou atividade em escala nanomolar para a forma amastigota de *T. cruzi* (RODRIGUEZ, 2016). A partir desse composto, foram sintetizados diferentes análogos que também têm demonstrado boa atividade anti-*T. cruzi* com grande afinidade pela enzima em estudos de *docking* (CHAO et al., 2017, 2019).

Outra enzima envolvida na cadeia de reações necessárias à síntese do ergosterol é a CYP51. Essa enzima é considerada essencial para esse processo, devido a isso sua inibição possui grande importância como alvo terapêutico (LEPESHEVA; VILLALTA; WATERMAN, 2011).

Como todas as enzimas do grupo dos citocromos P450, ela contém um grupamento heme como cofator (protoporfirina IX). Algumas classes de compostos demonstram inibir essa enzima, a principal delas são os derivados azólicos como posaconazol e o E1244 (pró-droga do ravuconazol), ambos chegaram a fase de ensaios clínicos (SALOMÃO; DE CASTRO, 2017; URBINA, 2015). O posoconazol foi testado em dois ensaios clínicos importantes com pacientes crônicos, o STOPCHAGAS e o CHAGASAZOL. No entanto, nenhum desses derivados demonstrou manter uma resposta antiparasitária com o tempo, indicando eficácia insuficiente como monoterapia (MOLINA et al., 2014; MORILLO et al., 2017; TORRICO et al., 2018). Além deles, os compostos VNI e VNF, dois imidazóis inibiram *in vitro* completamente a atividade da enzima, além de não afetar a atividade da enzima homóloga humana, baixa toxicidade e matar 99% de amastigotas na concentração de 1 μ M (LEPESHEVA et al., 2010a, b).

2.10.4 Tripanotiona redutase (TR)

A enzima TR participa de um sistema essencial, junto com a enzima tripanotiona sintase, para a sobrevivência do parasito (FLOHÉ, 2012). Ela catalisa a redução do dissulfeto de tripanotiona em tripanotiona e esta reação depende de NADPH, mantendo o equilíbrio redox intracelular e com um papel antioxidante, defendendo o parasito do estresse oxidativo (KRIEGER et al., 2000).

Alguns compostos testados para esta enzima têm origem do reposicionamento de fármacos (*drug repositioning* ou *drug repurposing*). Alguns exemplos são a tioridazina (neuroléptico) e a clomipramina (antidepressivo). Ambos demonstraram ser inibidores irreversível da TR, com atividade antichagásica em camundongos infectados com a doença de Chagas, reduzindo as taxas de mortalidade, alterações histológicas e eletrocardiográficas dos animais (FAURO et al., 2013; LO PRESTI et al., 2015). Além desses, outros compostos foram testados e levam à inibição de TR, são eles: clorpromazina, proclorperazina, triflupromazina, idatralina entre outros (VÁZQUEZ et al., 2017).

Contudo, nenhum inibidor dessa enzima encontra-se em estudos clínicos para a doença de Chagas.

2.10.5 Cruzaína

A cruzaína, também chamada cruzipaína, GP57/51 ou TCC, constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno-proteases do *T. cruzi* e é a enzima-chave da replicação intracelular do parasito (ALVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012). Está presente em todas as formas evolutivas do parasito, tendo envolvimento também no escape ao sistema imune do hospedeiro, representando um alvo molecular para o desenho de novos fármacos anti-parasitários que tem sido extensivamente descrito na literatura (DOYLE et al., 2011; MARTINEZ-MAYORGA et al., 2015).

O inibidor mais conhecido e potente dessa enzima é o K777, da classe das vinil sulfonas, que demonstrou atividade anti-chagásica tanto *in vitro* quanto *in vivo* (BARR et al., 2005; DOYLE et al., 2007; ENGEL et al., 1998). Estudos pré-clínicos de segurança e toxicologia foram iniciados para concluir a avaliação clínica do composto, no entanto foram interrompidos, pois verificou-se a baixa tolerabilidade em primatas e cães (DNDi, 2014).

Entretanto, não só ensaios de alvos específicos são utilizados na busca por um fármaco. Esses estudos muitas vezes são aliados a estudos fenotípicos (CHATELAIN; IOSET, 2018). Sendo assim, os compostos deste trabalho foram sendo investigados *in silico* com relação às suas afinidades por diferentes alvos de *T. cruzi*, bem como alvos de toxicidade e imunológicos. Também foram utilizados bancos de dados e ferramentas computacionais para acessar características de toxicidade, farmacocinética e farmacodinâmica dos compostos. Além disso, foram avaliados *in vitro* quanto à ação anti-*T. cruzi*; à citotoxicidade; à capacidade imunomoduladora; e com relação ao perfil de morte celular induzido por eles.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ESTUDOS *IN SILICO*

3.1.1 Definição de características de Absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)

A ferramenta online *SwissADME* (<http://www.swissadme.ch/>) foi utilizada para avaliar as características de ADME dos compostos. A mesma oferece acesso gratuito a um conjunto de modelos preditivos rápidos, porém robustos, para propriedades físico-químicas, farmacocinética e semelhança a fármacos ou *druglikeness* (DAINA; MICHIELIN; ZOETE, 2017). Essa plataforma fornece dados sobre a violação de 5 métricas comumente utilizadas pela indústria farmacêutica: Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge.

A regra de Lipinski é também chamada de regra dos cinco, que estabelece que é recomendável que moléculas com maior potencial de se tornarem fármacos tenham as seguintes características: coeficiente de partição (logP) maior ou igual a 5, massa molecular menor ou igual a 500, aceptadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 10 e doadores de ligação de hidrogênio menor ou igual a 5 (LIPINSKI et al., 1997). A regra de Ghose define que a molécula deve ter peso molecular de 160Da a 480Da, o logP deve ser entre -0,4 a 5,6 e o número total de átomos do composto deve ser de 20 a 70 (GHOSE et al., 1999). A regra de Veber sugere que o composto deve possuir ligações com rotação em número menor ou igual a 10 e a área de superfície polar (*Polar surface area*, PSA) deve ser menor ou igual a 140Å² (VEBER et al., 2002). Já Egan leva em consideração que os valores de logP devem estar na faixa entre -1 e 5,8 e a PSA ≤ 130 Å² (EGAN et al., 2000). Por último, a regra de Muegge indica que o composto deve apresentar massa molar entre 200 a 600 g/mol, o logP deve ser menor ou igual a 5, o número de aceptadores de ligação de hidrogênio deve ser menor ou igual a 10, o número de doadores de ligação de hidrogênio deve ser menor ou igual a 5, o número de ligações com rotação deve ser menor ou igual a 15 e a PSA deve ser menor ou igual a 150 Å² (MUEGGE et al., 2001).

3.1.2 Predição de alvos

Foi utilizada a ferramenta *online* ProTox-II para verificar as características de toxicidade dos compostos (BANERJEE et al., 2018). Para se encontrar possíveis alvos biológicos em que os compostos possam atuar, foi utilizada a ferramenta *online Similarity Ensemble Approach* (SEA, Abordagem por Conjunto de Similaridade) (KEISER et al., 2007).

3.1.3 Docking molecular

As estruturas de todos os compostos foram desenhadas utilizando-se o programa SPARTAN 08' (Wavefunction, Inc.) e a otimização de cada estrutura foi realizada utilizando o método RM1 (ROCHA et al., 2006), disponível como parte do programa SPARTAN 08', usando as configurações padrão para o critério de convergência. Os cálculos de *docking* molecular foram realizados utilizando alvos obtidos no *Protein Data Bank* (<http://www.rcsb.org>), os quais estão descritos no quadro 7.

Quadro 7 – Componentes utilizados para cálculo do *docking* molecular.

Alvo	Código (PDB)	Resíduos flexíveis
Cruzaína	3IUT	CYS25, TRP26, ASP60, SER64, LEU67, MET68, ASN70, MET160, ASP161 e LYS162
14-alfa demetilase	3K1O	TYR103, MET106, PHE110, TYR116, PHE290, THR295, LEU356, MET358, MET360 e MET460
Esqualeno sintase	3WCA	SER44, PHE45, TYR64, VAL167, LEU175, LEU203, GLN204, ASN207, TYR270 e PHE282
Tripanotiona redutase	4NEW	LEU18, GLU19, TRP22, THR26, ASN106, ILE107, SER110, TYR111, MET114 e LEU121
MAOA	2ZX5	ILE180, ASN181, PHE208, GLN215, ILE335, PHE352, TYR444
MAOB	2V5Z	PHE103, LEU171, CYS172, ILE199, GLN206, ILE316, TYR326, TYR398, TYR435
TLR2	3A79	PHE266, PHE284, LEU317, ILE319, PHE325, LEU328, VAL343, PHE349
TLR4	3FXI	ARG264, ASP294, TYR296, LYS341, LYS362, GLN436, PHE440, LEU444, PHE463
TNFR	1EXT	SER74, CYS76, ARG77, VAL95, CYS96, TYR106, GLU109, ASN110, LEU111, PHE112
IFNGR	1FG9	TYR49, ASN53, SER54, ASN79, LYS98, GLU101, ARG106, HIS205, TRP207
IL2R	2ERJ	ARG36, LYS38, SER39, SER41, LEU42, TYR43, LEU45, ASN57
IL4R	3BPL	TYR13, ASP66, ASP67, SER70, ASP72, ASP125, TYR127, TYR183
IL6R	1P9M	LEU108, GLU163, SER228, PHE229, TYR230, GLU277, PHE279
IL10R	1J7V	TYR43, ARG76, ARG96, PHE143, SER190, ARG191,
IL17Ra	4HSA	THR25, LEU27, TRP31, LEU86, LEU88, ASN89, ASN91, GLU92, LYS135

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

3.1.3.1 Gold

O programa GOLD 5.7.2 (*Cambridge Crystallographic Data Centre*, UK) foi utilizado para realizar os cálculos de *docking* molecular, utilizando a função de pontuação ChemPLP. Para se levar em consideração os graus de liberdade do receptor, com o intuito de simular melhor o ajuste induzido (*induced fit*), os aminoácidos descritos no quadro 7 foram tratados como flexíveis durante o cálculo, utilizando-se a estratégia da “biblioteca de conformeros” do programa GOLD.

Posteriormente, o programa BINANA (DURRANT; MCCAMMON, 2011) foi utilizado para analisar as interações intermoleculares das soluções de *docking*, utilizando-se os parâmetros padrão. As figuras foram geradas utilizando-se o programa Pymol (DELANO, 2002).

3.1.3.2 AutoDock Vina

Para gerar os arquivos com as estruturas dos ligantes no formato necessário (PDBQT) para executar o programa AutoDock Vina (TROTT e OLSON, 2010), foi utilizado o *script* prepare_ligand4.py, em Python, disponível na ferramenta MGLTools (SANNER et al., 1999; MORRIS et al., 2009). Os arquivos dos alvos também precisaram estar no formato PDBQT e para isso foi utilizado o *script* prepare_receptor4.py, igualmente disponível na ferramenta MGLTools (SANNER et al., 1999; MORRIS et al., 2009). Para a execução do programa AutoDock Vina, foram necessários apenas os arquivos das estruturas (ligantes e alvos) e um arquivo de configuração – config.txt. O arquivo de configuração continha todas as informações necessárias para o cálculo, dentre elas o ponto central para guiar o programa no espaço de busca, que foi definido para cada alvo (quadro 8). Este ponto coincidiu com o centro do ligante co-cristalizado para cada alvo. Foi utilizado um parâmetro *exhaustiveness* com valor de 64 para a realização de um cálculo mais robusto e preciso. Este parâmetro determina o número de buscas pela melhor solução de *docking*. Os resultados gerados pelo Autodock Vina são fornecidos em kcal/mol. Quanto menor a energia de ligação, maior a finidade predita pelo alvo.

Quadro 8 – Coordenadas utilizadas para definir o ponto central do cálculo de *docking* no programa AutoDock Vina.

Alvo	Coordenadas
MAOA	X = 41,126; Y = 26,795; Z = -15,023
MAOB	X = 51,713; Y = 156,183; Z = 28,029
TLR2	X = 16,38; Y = -39,753; Z = 35,412
TLR4	X = 27,581; Y = -13,54; Z = 15,679
TNFR	X = 0,182; Y = 27,329; Z = -6,873
IFNGR	X = 30,945; Y = 4,317; Z = -4,195
IL2R	X = 26,165; Y = 21,314; Z = -4,686
IL4R	X = 26,443; Y = -12,127; Z = -28,992
IL6R	X = -44,609; Y = 187,098; Z = 41,197
IL10R	X = 16,266; Y = 11,177; Z = 4,82
IL17Ra	X = -53,358; Y = 50,419; Z = -33,025

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

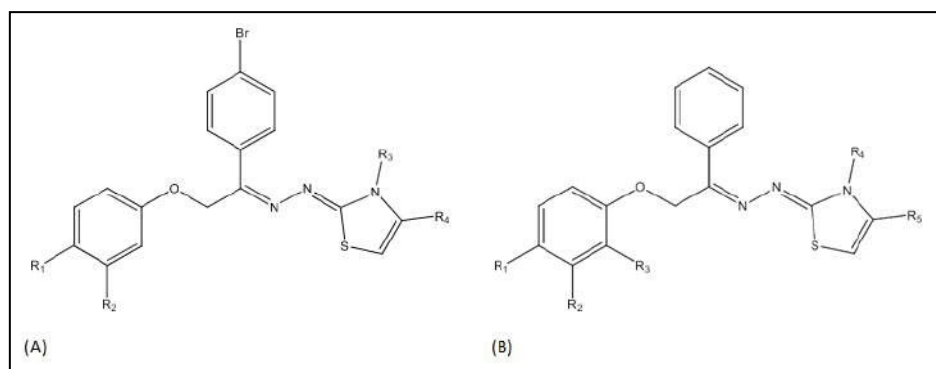
3.2 ESTUDOS *IN VITRO*

3.2.1 Compostos

Os treze compostos testados (JM-11, -13, -14 e -15 e LIZ-311, -321, -331, -411, -421, -431, -511, -521, -531) foram sintetizados em colaboração com o Laboratório de Planejamento e Síntese em Química Medicinal (LpQM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. As moléculas foram armazenadas a -20 °C até o momento dos ensaios na concentração estoque de 10 mg/mL. A estrutura geral dos compostos LIZ e JM está descrita na figura 10, enquanto seus substituintes e pesos moleculares estão descritos no quadro 9.

A estrutura geral dos compostos LIZ e JM está descrita na figura 9, enquanto seus substituintes e pesos moleculares estão descritos no quadro 9.

Figura 9 – Estrutura geral dos compostos LIZ e JM, respectivamente.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) Estrutura geral dos compostos LIZ e (B) dos compostos JM.

Quadro 9 – Substituintes e pesos moleculares dos compostos LIZ.

Compostos	R1	R2	R3	R4	R5	PM (g/mol)
JM-11	H	Cl	Cl	4-Metil-3-tiossemicarbazida	2-Bromoacetofenona	468,40
JM-13	Br	H	H	Tiossemicarbazida	2-Bromo 2 acetonaftona	514,44
JM-14	Br	H	H	4-Metil-3-tiossemicarbazida	2-bromoacetofenona	478,40
JM-15	Br	H	H	4-Fenil-tiossemicarbazida	2-Bromoacetofenona	540,47
LIZ-311	H	3-Metoxifenol	4-feniltiossemicarbazida	2-bromoacetofenona	-	570,50
LIZ-321	H	3-Metoxifenol	4-feniltiossemicarbazida	2-bromo-4'-fluoracetofenona	-	588,49
LIZ-331	H	3-Metoxifenol	4-feniltiossemicarbazida	2-bromo-4'metoxiacetofenona	-	600,53
LIZ-411	F	Cl	4-feniltiossemicarbazida	2-bromoacetofenona	-	592,91
LIZ-421	F	Cl	4-feniltiossemicarbazida	2-bromo-4'-fluoracetofenona	-	610,90
LIZ-431	F	Cl	4-feniltiossemicarbazida	2-bromo-4'metoxiacetofenona.	-	622,93
LIZ-511	Cl	Cl	4-feniltiossemicarbazida	2-bromoacetofenona	-	609,36
LIZ-521	Cl	Cl	4-feniltiossemicarbazida	2-bromo-4'-fluoracetofenona	-	627,35
LIZ-531	Cl	Cl	4-feniltiossemicarbazida	2-bromo-4'metoxiacetofenona	-	639,39

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A estereoquímica (E ou Z, EE ou ZZ) das moléculas não era conhecida experimentalmente, o que levou à necessidade de se fazer a modelagem molecular de todas as possíveis combinações de isômeros, pois isto afetaria o modo de ligação das moléculas com os alvos biológicos.

3.2.2 Animais

Os animais utilizados para obtenção de células esplênicas foram camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c, machos, com 6-8 semanas de idade, pesando 20 ± 2 g e provenientes do biotério da Fundação Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Pernambuco. O protocolo de experimentação animal utilizado no presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA) do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ-PE), com número 102/2016 (Anexo A).

3.2.3 Análise de citotoxicidade

3.2.3.1 Obtenção de esplenócitos e avaliação da atividade citotóxica dos compostos frente a células esplênicas.

Após sacrifício do animal em câmara de CO₂, removeu-se o baço de 5 camundongos em condições assépticas e colocou-se em tubo contendo meio *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI) 1640 (Sigma-Aldrich) +1% de antibiótico (incompleto). No fluxo vertical, transferiu-se cada baço para placa de Petri onde foram macerados utilizando a parte fosca de lâminas de microscopia. As suspensões celulares foram transferidas para tubos contendo aproximadamente 10 mL de meio RPMI de antibiótico por baço, centrifugadas 400 x g durante cinco minutos. O sedimento (contendo as células) foi ressuspensão em meio RPMI+1% de antibiótico+10% de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota da suspensão celular foi corada com azul de *trypan* para ser quantificada e verificada a viabilidade celular em câmara de *Neubauer*.

As células esplênicas (6×10^6 células/mL) de camundongos BALB/c foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI completo. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em diferentes concentrações (3,13; 6,25; 12; 25; 50; 100 µg/mL) durante 24h em estufa de CO₂ a 37°C. Após esse período, foi adicionado o *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide* (MTT) na concentração de 5 mg/mL em tampão fosfato salino (*phosphate buffered saline*, PBS), seguido de nova incubação por 6h. Posteriormente, as células foram centrifugadas (3.000 RPM, 10 min), adicionado 100 µl de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 570 nm em leitor de ELISA. Cada composto foi testado em duplicata. O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade da droga de referência benzonidazol. A partir dos valores de inibição da cultura, foi obtida a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀).

3.2.3.2 Avaliação da atividade citotóxica em linhagens hepática, fibroblásticas e macrofágicas

As células (10^5 células/mL) foram semeadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI completo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C por 24h. Posteriormente, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL), sendo novamente incubados durante 48h. Cada composto foi testado em duplicata. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 2h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 570 nm. O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade da droga de referência benzonidazol. A partir dos valores de inibição da cultura, foi obtida a CC₅₀.

3.2.4 Avaliação da atividade tripanocida dos compostos

3.2.4.1 Epimastigotas

Para determinar o efeito antiproliferativo para formas epimastigotas da cepa DM28c (10^6 parasitos/mL), mantidas em meio LIT+1% de antibiótico+20% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 27 °C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/mL) por 96h. Testou-se cada composto em duplicata. O controle negativo da reação foi poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benzonidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de *Neubauer* e, a partir desses valores, obteve-se a IC₅₀ (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitos).

3.2.4.2 Tripomastigotas

As formas tripomastigotas (cepa Y) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* (10^7 parasitos) da linhagem de células L929, após estas obterem confluência em cultura. Para determinar o efeito antiproliferativo para formas tripomastigotas da cepa Y (4×10^6 parasitos/mL), mantidas em meio RPMI+1% de antibiótico+5% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 37°C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos

(0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/mL) por 24h a atmosfera de 5% de CO₂. Testou-se cada composto em duplicata. Obteve-se como controle negativo da reação poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benzonidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de *Neubauer* e, a partir desses valores, obteve-se a IC₅₀.

3.2.4.3 Amastigotas

O ensaio da beta-galactosidase, desenvolvido por Buckner e colaboradores (1996), com modificações (ROMANHA et al., 2010) foi utilizado para avaliar a forma amastigota de *T. cruzi*. Este ensaio colorimétrico utiliza a cepa Tulahuen de *T. cruzi* que expressa o gene da beta-galactosidase de *Escherichia coli*. Os compostos foram testados nas concentrações de 20; 10; 5; 2,5; 1,25 e 0,63 µg/mL e a partir porcentagem de inibição do crescimento parasitário, obteve-se a IC₅₀.

3.2.5 Dosagem de óxido nítrico (ON) em sobrenadante de cultura de macrófagos

A linhagem de macrófago J774 foi mantida e expandida em meio RPMI completo, em condições axênicas até momento dos testes. As células foram plaqueadas (10⁵ células/mL) em placas de 96 poços e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante 2h. Após esse período, as culturas foram lavadas com meio de cultura, removendo-se as células não aderentes. Em seguida, as células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ na presença de diferentes concentrações dos compostos (6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200 µg/mL). Também foram feitos poços com lipopolissacarídeo (LPS–100 ng/mL), poços sem tratamento e a droga de referência foi o benzonidazol. Após 48h, foi transferido 50 µl do sobrenadante de cada poço para placas de 96 poços e igual volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida 1% e dihidrocloronaftiletileno diamina 0,1% em H₃PO₄ a 0,3 M) foi adicionado para avaliar a quantidade de ON. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 540 nm e a concentração de ON foi determinada comparando-se a absorbância das amostras com uma curva padrão preparada com nitrito de sódio. Foi determinado o percentual de produção de ON de cada composto comparando-se os resultados das absorbâncias com os das culturas não tratadas com os compostos.

3.2.6 Obtenção de sobrenadante de cultura de células esplênicas

Os baços foram processados como descrito no item 5.2.3.1. As suspensões de células esplênicas foram depositadas em placas de 24 poços (10^6 células/mL), em duplicata. As células foram tratadas com 1x, 2x e 4x a IC_{50} (tripomastigotas e amastigotas) dos diferentes compostos de acordo com protocolo estabelecido e as placas mantidas em estufa à 37 °C, 5% de CO_2 durante 24, 48, 72h e 6 dias (tempo padronizado mediante ensaio cinético prévio). A droga de referência foi o benzonidazol e utilizou-se como controle de estimulação a concanavalina A (ConA), e o controle sem tratamento foi denominado de basal. Após o tempo de incubação, centrifugaram-se as placas (400 x g por 10 min, a temperatura ambiente.) e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -20°C para posterior utilização na dosagem de citocinas por citometria de fluxo.

3.2.7 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

As citocinas $TNF-\alpha$, $IFN-\gamma$, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A foram mensuradas em sobrenadante de cultura de esplenócitos murinos tratados ou não com os compostos. Foi utilizado o kit CBA *mouse* Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560485, BD Bioscience, San Jose, CA) segundo recomendações do fabricante. Os limites de detecção das citocinas, segundo o fabricante, são: IL-2- 0,1 pg/mL; IL-4- 0,03 pg/mL; IL-6- 1,4 pg/mL; IL-10- 16,8 pg/mL; $TNF-\alpha$ - 0,9 pg/mL; $IFN-\gamma$ - 0,5 pg/mL; IL-17A- 0,8 pg/mL. A aquisição dos dados foi feita através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3 (Soft Flow Inc).

3.2.8 Avaliação de morte celular

Os tripomastigotas (4×10^6 células/mL) foram tratadas com a concentração referente à IC_{50} (1x e 2x). O controle negativo para todos os ensaios de morte celular foram células não tratadas e a droga de referência foi o Benzonidazol.

3.2.8.1 Anexina V-7-aminoactinomicina D (AV-7AAD)

As formas tripomastigotas foram incubadas por 24h na presença de 1x e 2x a IC_{50} dos compostos para essa forma evolutiva, à atmosfera de 5% de CO_2 e 37 °C. Após a incubação com os compostos, foram marcados com 7-aminoactinomicina D (7-AAD) e anexina V (AV) utilizando o kit de detecção de apoptose de AV-FITC (Ebioscience, San Diego, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. O experimento foi realizado utilizando um citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton-Dickinson, San José, EUA), adquirindo-se 20.000 eventos da região parasitária, utilizando o canal FL1-H para AV-FITC e o canal FL3-H para 7-AAD. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo® (Tree Star Inc ©, Ashland, EUA) e expressos como a percentagem de parasitos em cada quadrante (não marcadas, marcadas apenas com 7-AAD, marcadas apenas com AV ou marcadas com ambos) em comparação com o número total de células analisadas.

3.2.8.2 Calceína/homodímero de etídio

A viabilidade parasitária também foi avaliada pela função de esterase celular e integridade da membrana utilizando-se o kit *LIVE/DEAD® Viability/Cytotoxicity* (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA) seguindo as recomendações do fabricante. As células parasitárias controle (não tratadas) e tratadas foram coletadas por centrifugação após 24 horas de incubação e ressuspensas em 0,5 mL de PBS contendo 0,1 μ M de calceína e 8 μ M de homodímero de etídio. As amostras foram incubadas por 30 minutos em temperatura ambiente e imediatamente analisadas por citometria de fluxo nos canais FL1-H para calceína e FL3-H para o homodímero de etídio. As leituras foram feitas em citômetro de fluxo. O controle positivo foi o mesmo já mencionado.

3.2.8.3 Avaliação de compartimentos ácidos celulares e potencial de membrana mitocondrial

Os tripomastigotas (4×10^6 células/mL) foram tratados com a IC_{50} e incubadas a 37°, 5% CO_2 por 24h. As células tratadas e não tratadas foram lavadas e ressuspensas em 0,5 mL de PBS com 10 μ g/mL de Rodamina 123 (Rho 123, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) ou 10 μ g/mL de laranja de acridina (LA, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) por 20 minutos. Após isto, os parasitos foram lavados em PBS e imediatamente analisados por

citometria de fluxo, e as intensidades de fluorescência para LA (compartimentos ácidos) e Rho 123 (potencial da membrana mitocondrial) foram quantificadas. O controle positivo foi a saponina (0,1%). Foram adquiridos 20.000 eventos. Alterações nas intensidades de fluorescência de rodamina ou laranja de acridina foram quantificadas pelo índice de variação (IV) obtido pela equação: $IV = (MT - MC) / MC$, onde MT é a mediana de fluorescência para parasitos tratados e MC é a média do controle não tratado e marcado.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada empregando-se testes não paramétricos. Foi feito teste de regressão linear simples para obtenção da CC_{50} e da IC_{50} . A análise para medir a variabilidade entre o grupo tratado foi o teste Wilcoxon; e entre grupos tratado e controle, o teste Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 ESTUDOS *IN SILICO*

4.1.1 Definição de características de Absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADME)

Após as estruturas dos compostos serem fornecidas ao *SwissADME*, alguns parâmetros de absorção, distribuição e excreção foram calculados para cada molécula. Com relação à solubilidade em água, a plataforma gera diferentes dados, um deles é a classificação de solubilidade em água por dois diferentes métodos: *Estimated Solubility* (ESOL, Solubilidade estimada), Ali e IT (programa *FILTER-IT*). Com relação à classe ESOL, 100% dos compostos foram classificados como pouco solúveis. Já para a classe Ali, 53,85% dos compostos foram pouco solúveis, enquanto que 46,15% foram insolúveis. Na classificação IT, 15,38% foram pouco solúveis e 84,62% dos compostos foram insolúveis. No geral, em todos os tipos de classificação os compostos são pouco solúveis ou insolúveis em água (quadro 10).

Quadro 10 – Dados *in silico* de parâmetros de solubilidade em água de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

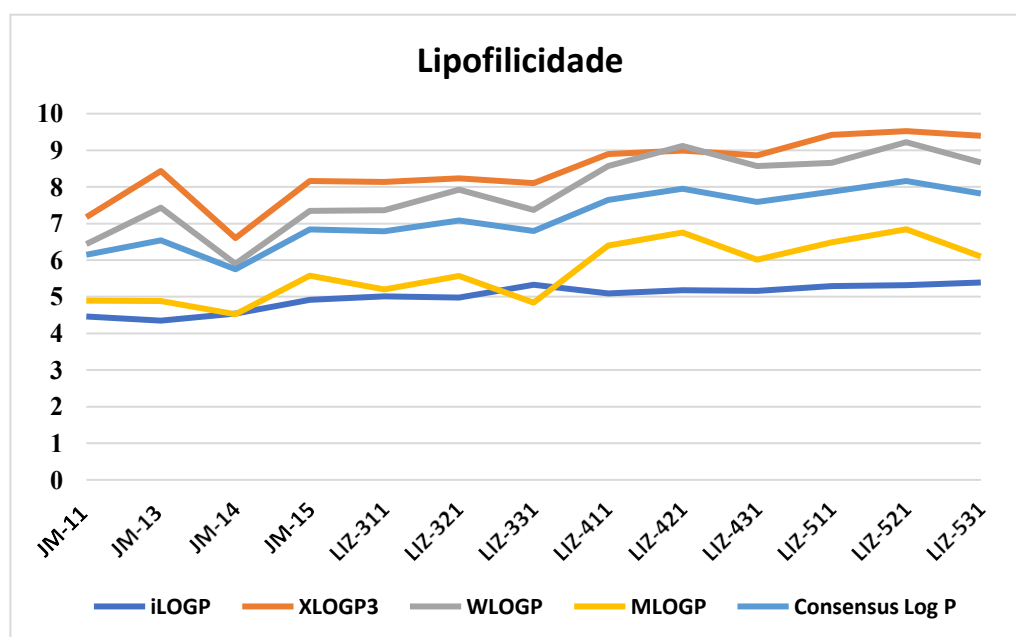
Composto	Classe ESOL	Classe Ali	Classe IT
JM-11	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel
JM-13	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Insolúvel
JM-14	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Pouco solúvel
JM-15	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Insolúvel
LIZ-311	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Insolúvel
LIZ-321	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Insolúvel
LIZ-331	Pouco solúvel	Pouco solúvel	Insolúvel
LIZ-411	Pouco solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LIZ-421	Pouco solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LIZ-431	Pouco solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LIZ-511	Pouco solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LIZ-521	Pouco solúvel	Insolúvel	Insolúvel
LIZ-531	Pouco solúvel	Insolúvel	Insolúvel

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Além disso, também são gerados dados sobre a lipofilicidade dos compostos. Para isso, o *SwissADME* utiliza diferentes programas (iLogP, XLogP, WLogP, MLogP) para

obter os coeficientes de partição (LogP), além de calcular a média de todos esses dados em um LogP consenso (*Consensus LogP*). Ao observar o gráfico 1, é possível inferir que os valores de XLogP e WLogP são mais semelhantes entre si, ocorrendo o mesmo entre iLogP e MLogP. O LogP consenso de todos os compostos ficou entre 5 e 8, tendo JM-14 o menor valor (5,75) e LIZ-521 o maior valor (8,16). Ou seja, JM-14 é o composto menos lipofílico enquanto LIZ-521 é o composto mais lipofílico.

Gráfico 1 – Dados *in silico* de lipofilicidade (iLogP, XLogP, WLogP, MLogP e *Consensus LogP*) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: iLogP, XLogP, WLogP, MLogP = programas utilizados para o cálculo de LogP; Consensus LogP = valor de LogP que normaliza todos os valores obtidos nos diferentes programas.

Na avaliação de farmacocinética são gerados dados sobre absorção pelo trato gastrointestinal (TGI), permeabilidade da barreira hematoencefálica (BHE), se são substratos da glicoproteína P (P-gP), inibição de diferentes enzimas do citocromo P450 (denominadas CYP) entre outros. Quanto à absorção pelo TGI, com exceção de JM-11 e JM-14 que têm alta absorção predita, a maioria dos compostos (84,62%) possui baixa absorção por essa via (quadro 11). Além disso, nenhum composto demonstrou permeabilidade pela BHE predita.

Quadro 11 – Dados *in silico* de parâmetros de farmacocinética (absorção pelo trato gastrointestinal e permeabilidade pela barreira hematoencefálica) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

Composto	Absorção (TGI)	Permeabilidade (BHE)
JM-11	Alta	Não
JM-13	Baixa	Não
JM-14	Alta	Não
JM-15	Baixa	Não
LIZ-311	Baixa	Não
LIZ-321	Baixa	Não
LIZ-331	Baixa	Não
LIZ-411	Baixa	Não
LIZ-421	Baixa	Não
LIZ-431	Baixa	Não
LIZ-511	Baixa	Não
LIZ-521	Baixa	Não
LIZ-531	Baixa	Não

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: TGI = trato gastrointestinal, BHE = barreira hematoencefálica.

No que diz respeito à possibilidade de os compostos serem substratos da P-gP, com exceção de JM-14, LIZ-311 e LIZ-331, a maioria destas moléculas (76,92%) pode ser substrato dessa proteína (quadro 12).

Quadro 12 – Dados *in silico* de parâmetros de farmacocinética (substrato da glicoproteína P) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

Composto	Substrato (P-gP)
JM-11	Sim
JM-13	Sim
JM-14	Não
JM-15	Sim
LIZ-311	Não
LIZ-321	Sim
LIZ-331	Não
LIZ-411	Sim
LIZ-421	Sim
LIZ-431	Sim
LIZ-511	Sim
LIZ-521	Sim
LIZ-531	Sim

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: P-gP = glicoproteína P.

No que concerne à possibilidade de inibição das proteínas da superfamília do citocromo P450, a maioria dos compostos aparenta não inibir essas proteínas (quadro 13).

Quadro 13 – Dados *in silico* de parâmetros de farmacocinética (inibição de proteínas da superfamília P450) pelo de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

Composto	CYP1A2	CYP2C19	CYP2C9	CYP2D6	CYP3A4
JM-11	Não	Sim	Sim	Não	Sim
JM-13	Não	Sim	Não	Não	Sim
JM-14	Sim	Sim	Sim	Não	Sim
JM-15	Não	Sim	Não	Não	Não
LIZ-311	Não	Sim	Não	Não	Sim
LIZ-321	Não	Não	Não	Não	Sim
LIZ-331	Não	Não	Não	Não	Não
LIZ-411	Não	Sim	Não	Não	Não
LIZ-421	Não	Não	Não	Não	Sim
LIZ-431	Não	Não	Não	Não	Sim
LIZ-511	Não	Não	Não	Não	Não
LIZ-521	Não	Não	Não	Não	Não
LIZ-531	Não	Não	Não	Não	Não
Porcentagem (inibição)	7,69%	46,15%	15,38%	0%	53,85%

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: CYP = denominação dada às proteínas da superfamília do citocromo P450.

Outros dados gerados são as violações a algumas regras importantes na química medicinal, que indicam se um composto possui potencial uso como fármaco (*druglikeness*), por exemplo se pode ter uma boa biodisponibilidade oral (regra de Lipinski). As regras levadas em consideração na plataforma para gerar dados de *druglikeness* são: Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge (tabela 1).

Com exceção de JM-11 e JM-14, que quebraram um critério da regra de Lipinski (MLogP >4,15), a maioria dos compostos quebrou dois critérios (peso molecular >500 e MLogP >4,15). O MLogP, ou LogP de Moriguchi, é um parâmetro recente introduzido na regra de Lipinski, onde se um composto possui LogP <5 ou MLogP <4,15 ele se adequa à regra. Também com exceção de JM-11 e JM-14, que quebraram apenas um critério da regra de Ghose (WLogP >5,6), a maioria dos compostos quebrou três critérios (peso molecular >480, WLogP >5,6, refratividade molar >130). Nenhum composto quebrou a regra de Veber e todos quebraram um critério da regra de Egan (WLogP >5,88).

Em relação à regra de Muegge, sete compostos quebraram um critério ($XLogP3 > 5$) e seis quebraram dois critérios (peso molecular > 600 e $XLogP3 > 5$). Apenas dois compostos tiveram *score* de biodisponibilidade (SB) de 0,55.

Tabela 1 – Dados *in silico* de parâmetros de *druglikeness* (quantidade de violações de importantes critérios em regras da química medicinal) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

Composto	Lipinski	Ghose	Veber	Egan	Muegge	SB
JM-11	1	1	0	1	1	0,55
JM-13	2	3	0	1	1	0,17
JM-14	1	1	0	1	1	0,55
JM-15	2	3	0	1	1	0,17
LIZ-311	2	3	0	1	1	0,17
LIZ-321	2	3	0	1	1	0,17
LIZ-331	2	3	0	1	2	0,17
LIZ-411	2	3	0	1	1	0,17
LIZ-421	2	3	0	1	2	0,17
LIZ-431	2	3	0	1	2	0,17
LIZ-511	2	3	0	1	2	0,17
LIZ-521	2	3	0	1	2	0,17
LIZ-531	2	3	0	1	2	0,17

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: SB = *Score* de biodisponibilidade.

4.1.2 Predição de alvos para toxicidade

Utilizando-se a base de dados Protox-II, foi possível buscar por possíveis alvos de toxicidade para as moléculas em estudo, além de possíveis características de toxicidade que elas podem demonstrar. Este procedimento *in silico* normalmente é baseado na similaridade química encontrada com os compostos que estão depositados nessa base de dados, e que já tem suas informações de toxicidade conhecidas experimentalmente. Ao fazer este cruzamento de informações entre as estruturas dos compostos e a base de dados, são obtidos dados preditos de: toxicidade aguda, como a Dose Letal para 50% dos animais (DL_{50}) predita, a classificação de toxicidade (1 a 6, sendo 1 a mais tóxica e 6 a menos tóxica), média de similaridade e predição de acurácia (em porcentagem); toxicidade de órgãos (hepatotoxicidade); desfechos de toxicidade (carcinogenicidade, mutagenicidade, citotoxicidade e imunotoxicidade); vias toxicológicas e alvos de toxicidade.

Com relação à porcentagem de similaridade, ela variou entre 36,98% (LIZ-321) e 43,88% (JM-13) e a média dos 13 compostos foi de 38,34% (tabela 2). Já a predição de

acurácia variou de 23% (maioria dos compostos) a 54,23% (JM-13), com média de 25,40%. Ou seja, o composto JM-13 é o que mais tem similaridade com os compostos da base de dados e melhor predição de toxicidade. Devido a possuir melhores valores de acurácia e predição de similaridade, o composto JM-13 foi o único em que foi possível encontrar um alvo predito de toxicidade, que foi a enzima monoamina oxidase A (MAOA) humana.

Tabela 2 – Dados *in silico* de similaridade e predição de acurácia (em porcentagem) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

Composto	Similaridade (%)	Predição de acurácia (%)
JM-11	37,48%	23%
JM-13	43,88%	54,26%
JM-14	38,93%	23%
JM-15	38,85%	23%
LIZ-311	38,16%	23%
LIZ-321	36,98%	23%
LIZ-331	38,22%	23%
LIZ-411	37,28%	23%
LIZ-421	37,04%	23%
LIZ-431	37,28%	23%
LIZ-511	38,44%	23%
LIZ-521	37,37%	23%
LIZ-531	38,48%	23%
Média	38,34%	25,4%

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Outro dado disponibilizado é a classificação predita de toxicidade. Na tabela 3 estão descritos os resultados dessa classificação em que é possível verificar que a maior parte dos compostos foram denominados como classe 6, ou seja, não apresenta grande probabilidade de ser tóxico.

Tabela 3 – Classificação predita (*in silico*) de toxicidade (1 a 6) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

Composto	Classificação de toxicidade
JM-11	4
JM-13	3
JM-14	4
JM-15	6
LIZ-311	6
LIZ-321	6
LIZ-331	6
LIZ-411	6
LIZ-421	6
LIZ-431	6
LIZ-511	6
LIZ-521	6
LIZ-531	6

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Além dos dados previamente expostos, é possível obter dados de predição desfechos de toxicidade de órgãos. A base de dados reúne esses dados em um campo denominado Relatório de Modelo de Toxicidade. À probabilidade de haver um determinado desfecho ou toxicidade orgânica, é atribuído um valor que varia de 0 a 1, em que 0 é improvável e 1 provável. No geral, valores de probabilidade acima de 0,7 são considerados fortemente ativos/inativos, ou seja, são resultados de predição mais seguros.

Para facilitar a exposição dos dados, eles estão descritos de maneira numérica e classificados em ativos/inativos nesta seção. De acordo com este relatório relativo aos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis, o provável desfecho de toxicidade é para células imunes, pois foi o único que teve resultados acima de 0,7 tanto para inatividade quanto para atividade (tabela 4) Dentro deste desfecho, a maioria dos compostos (JM-11, JM-14, JM-15, LIZ-411 e LIZ-511) é provavelmente atóxico para células imunes (inativos). Já LIZ-321, foi o único que o resultado foi “ativo” para esse tipo de célula (0,87).

Tabela 4 – Relatório de Modelo de Toxicidade (*in silico*) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis.

Composto	Hepatotoxicidade	Carcinogenicidade	Imunotoxicidade	Mutagenicidade	Citotoxicidade
JM-11	Inativo (0,53)	Inativo (0,62)	Inativo (0,97)	Ativo (0,5)	Inativo (0,66)
JM-13	Ativo (0,58)	Inativo (0,56)	Ativo (0,5 /)	Ativo (0,5 /)	Inativo (0,56)
JM-14	Inativo (0,51)	Inativo (0,59)	Inativo (0,95)	Ativo (0,51)	Inativo (0,6)
JM-15	Inativo (0,51)	Inativo (0,58)	Inativo (0,96)	Inativo (0,5)	Inativo (0,58)
LIZ-311	Inativo (0,5)	Inativo (0,58)	Ativo (0,52)	Inativo (0,51)	Inativo (0,62)
LIZ-321	Ativo (0,53)	Inativo (0,59)	Ativo (0,87)	Inativo (0,5)	Inativo (0,61)
LIZ-331	Ativo (0,5)	Inativo (0,58)	Ativo (0,66)	Inativo (0,52)	Inativo (0,63)
LIZ-411	Ativo (0,5)	Inativo (0,6)	Inativo (0,7)	Inativo (0,51)	Ativo (0,58)
LIZ-421	Ativo (0,5)	Inativo (0,6)	Ativo (0,61)	Inativo (0,51)	Inativo (0,58)
LIZ-431	Ativo (0,51)	Inativo (0,61)	Ativo (0,68)	Ativo (0,5)	Inativo (0,6)
LIZ-511	Inativo (0,53)	Inativo (0,6)	Inativo (0,92)	Inativo (0,51)	Inativo (0,57)
LIZ-521	Ativo (0,5)	Inativo (0,6)	Ativo (0,61)	Inativo (0,51)	Inativo (0,58)
LIZ-531	Inativo (0,52)	Inativo (0,61)	Ativo (0,57)	Inativo (0,5)	Inativo (0,58)

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.1.3 Predição de alvos de *Trypanosoma cruzi*

Para predição de alvos parasitários, foi utilizada a base de dados SEA. Não somente foram encontrados alvos de *T. cruzi*, como também foram encontrados alvos de diferentes organismos como humanos, bactérias, ratos entre outros. Com relação aos alvos que pertencem ao *T. cruzi*, o alvo que foi encontrado como potencial para os compostos foi a cruzaina, o qual foi apontado como provável alvo de JM-13 e LIZ-511. Os posicionamentos da cruzaina como possível alvo para esses compostos, foram 12º e primeiro, respectivamente.

Vale salientar que na plataforma SEA, do primeiro ao quarto mais prováveis alvos para JM-13, aparecem as enzimas MAOA e B, o que corrobora com a plataforma ProTox-II.

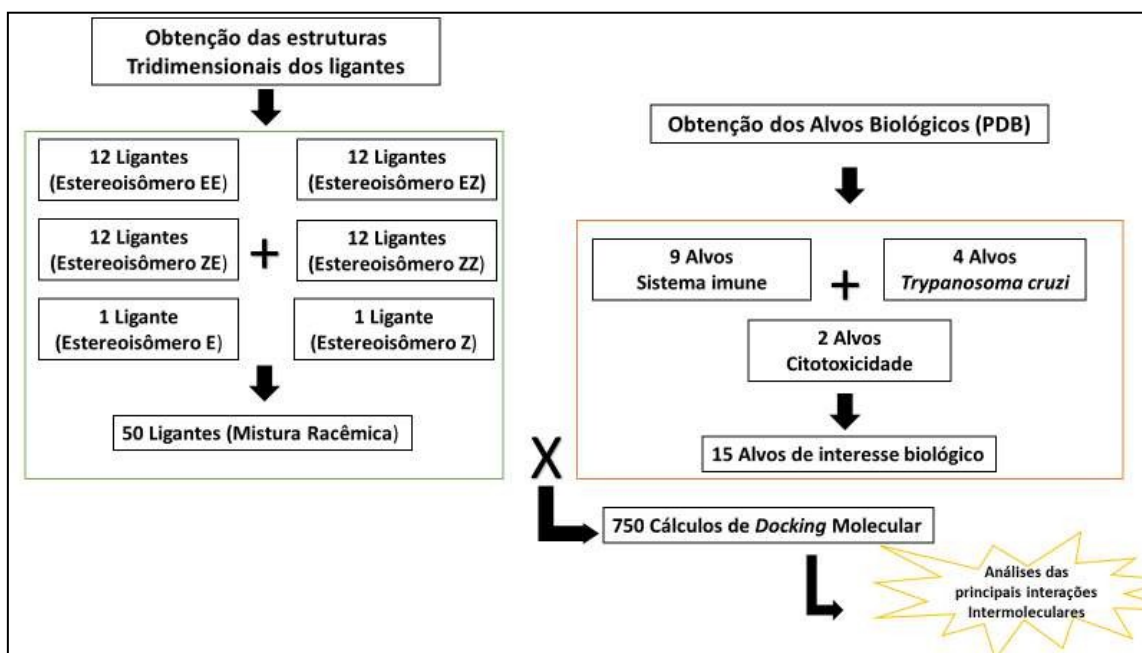
4.1.4 Docking molecular

Os cálculos de *docking* transcorreram de maneira rápida, levando em média três horas por alvo. Além disso, não foram observadas nenhuma mensagem de erro ou alerta nos programas usados. Os resultados do programa GOLD são gerados em forma de *scores*. A função de *score* é a ChemPLP, a qual fornece as maiores taxas médias de sucesso para esse teste e, portanto, é a função de pontuação padrão no GOLD. Esses

valores são adimensionais, ou seja, não representam valores de energia. Quanto maior o *score*, maior a afinidade predita pelo alvo.

Além da análise de valores de *score*, também foi feita a análise de interações entre os alvos e os compostos. As interações intermoleculares que o programa BINANA encontra são: contatos hidrofóbicos (forças não-covalentes do tipo apolares), ligações de hidrogênio (que ocorrem quando existe flúor, oxigênio ou nitrogênio como aceitadores como polo negativo, enquanto o hidrogênio ácido é o polo positivo), *t-stacking* (interação não covalente entre anéis aromáticos, em que o alinhamento dos anéis é semelhante à letra “T”), *pi-stacking* (interações não covalentes entre anéis aromáticos, geralmente um paralelo ao outro) e *cation-pi* (interação não covalente entre a face de um anel aromático e um cátion adjacente). A figura 10 traz um fluxograma do *docking* realizado no presente trabalho.

Figura 10 – Fluxograma do *docking* molecular de fenoxi-hidrazino-tiazóis.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: PDB = *Protein Data Bank*.

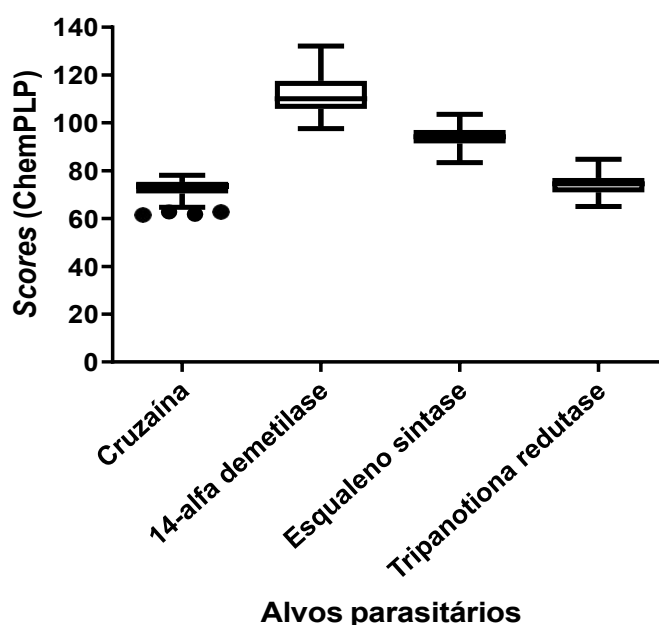
4.1.4.1 *Trypanosoma cruzi*

A análise panorâmica dos resultados de *docking* para os alvos parasitários estão descritos no gráfico 2. A mediana é mostrada com uma linha horizontal dentro da caixa. Os valores mínimo e máximo são mostrados com linhas horizontais curtas (*whiskers*)

enquanto os valores que representam pontos fora da média (*outliers*) são mostrados como pontos escuros fora dos intervalos definidos pelos *whiskers*.

Observando o gráfico 2, é possível verificar que os compostos demonstram maior afinidade pela enzima 14-alfa demetilase (CYP51), seguido por esqualeno sintase. Os valores de *score* de cruzaina e tripanotiona redutase foram bastante similares, com a diferença que, nos resultados da cruzaina houve 4 *outliers* (JM-11-EZ, JM-11-ZE, JM-11-ZZ e JM-14-EZ). Além disso, essa similaridade de resultados demonstra que os compostos possuem afinidades muito semelhantes entre si para estes alvos.

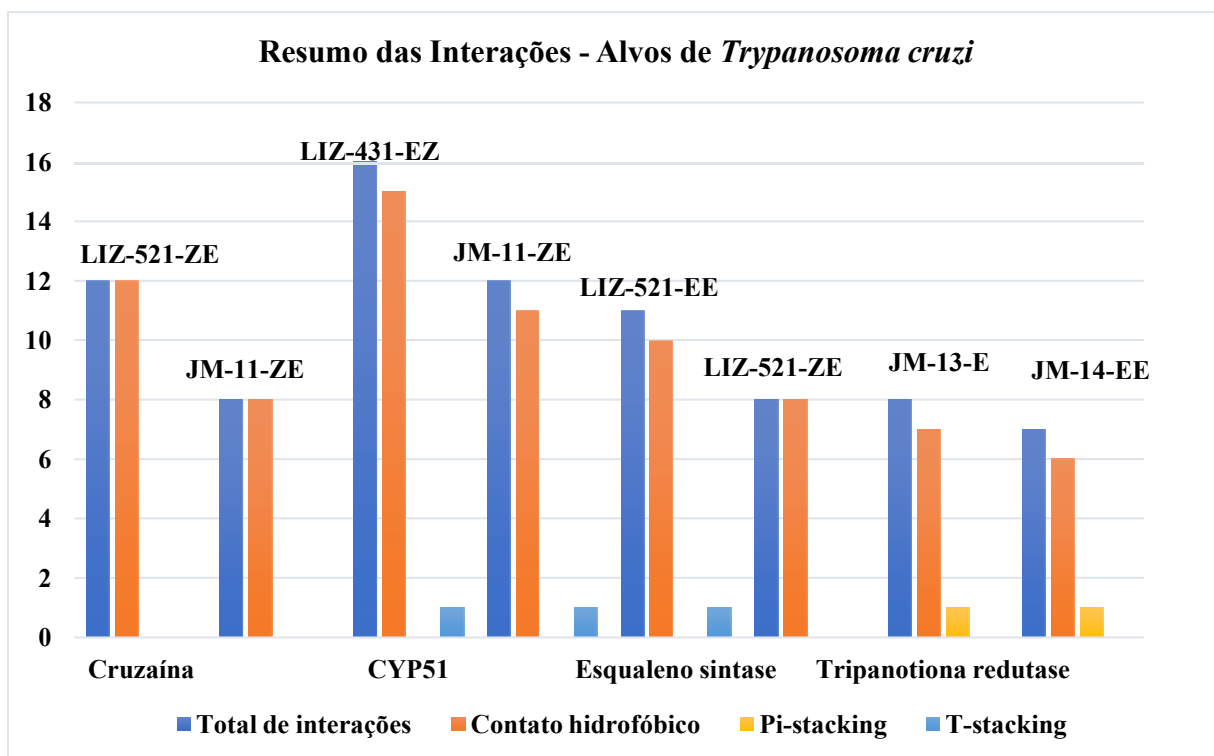
Gráfico 2 – Variação dos valores de *score* (ChemPLP) para cada alvo de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Além da análise geral de *scores*, também é interessante fazer uma análise geral das interações intermoleculares. No gráfico 3, o primeiro set de resultados (barras) é relativo ao composto (e seu isômero) melhor ranqueado, enquanto o segundo é relativo ao pior ranqueado. É possível verificar que cruzaina e 14- alfa demetilase (CYP51) foram os alvos em que houve o maior número de interações. No geral, contato hidrofóbico foi a interação que melhor diferenciou o melhor ranqueado do pior ranqueado.

Gráfico 3 – Resumo das interações intermoleculares entre os compostos e os alvos de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: CYP51 = 14-alfa demetilase.

A seguir estão descritos os valores de *score* de cada ligante em cada alvo parasitário analisado, bem como suas interações intermoleculares de maneira mais descritiva.

4.1.4.1.1 Cruzaína

Ao observar os valores de *score* (ChemPLP) das soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ (tabela 5), percebe-se que os compostos em sua conformação ZE possuem uma maior afinidade predita pelo sítio de ligação da enzima cruzaína, quando comparado com os outros isômeros. Por questão de estrutura da tabela e para a melhor compreensão dos resultados, colocamos os resultados dos isômeros E e Z do composto JM-13 na coluna de EE e ZZ, respectivamente, em todos os resultados referente ao *docking* desse composto.

Tabela 5 – Valores de *score* (ChemPLP) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para cruzaina.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	65,39	62,72	61,52	61,83
JM-13*	73,31	-	-	70,78
JM-14	65,77	62,76	66,79	64,74
JM-15	73,63	73,21	78	75,19
LIZ-311	74,99	71,18	72,79	72,13
LIZ-321	76,96	72,55	76,58	71,32
LIZ-331	73,49	76,68	73,01	68,9
LIZ-411	69,9	74,79	77,73	73,19
LIZ-421	73,53	75,93	77,14	74,18
LIZ-431	65,67	75,73	75,2	74,67
LIZ-511	71,64	75,1	77,59	70,9
LIZ-521	75,6	74,32	78,16	72,05
LIZ-531	76,8	68,88	74,97	73,69

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

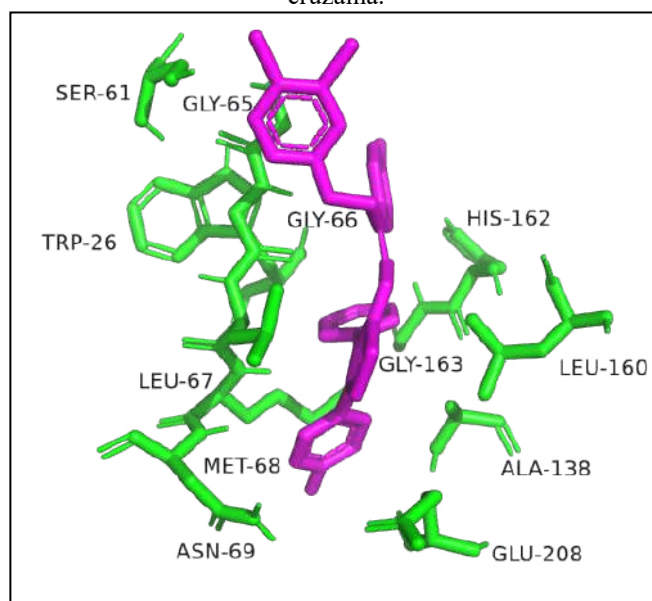
Importante destacar que o composto JM-11 apresentou três de seus isômeros entre os cinco valores pior ranqueados, além de oito compostos da série JM fazerem parte dos dez valores pior ranqueados. Interessantemente, ao utilizar a base de dados SEA para buscar por possíveis alvos dos compostos, para os compostos JM-13 e LIZ-511 a cruzaina apareceu como alvo predito. Se por um lado, o composto LIZ-511 foi o ranqueado com a quarta maior afinidade por essa enzima no *docking*, por outro lado o composto JM-13 foi apenas o 27º ranqueado. Isso corrobora com o posicionamento da cruzaina como possível alvo para estas moléculas, uma vez que para a LIZ-511, a cruzaina foi o alvo mais provável no SEA, enquanto para o JM-13 a enzima ficou na 12ª posição de possível alvo.

A diferença entre o menor *score* (61,52 referente ao JM-11-ZE) e o maior *score* (78,16 referente ao LIZ-521-ZE) é de 16,64 pontos. Esta diferença de *score* entre as soluções de *docking* com maior e menor afinidades obtidas se deve, aparentemente, ao maior volume do chassi (*scaffold*) molecular do composto LIZ-521, cujas diferenças em relação ao composto JM-11 consistem na alteração da posição dos átomos de cloro ligados ao primeiro anel benzeno da estrutura, um átomo bromo ligado ao segundo anel benzeno da estrutura do composto, a substituição do grupamento metóxi por um anel benzeno ligado ao átomo de nitrogênio do grupo tiazol, e um átomo de flúor ligado ao último anel benzeno da estrutura da molécula.

Ao analisar as interações intermoleculares, observa-se que os resíduos GLY65, LEU67, MET68, ALA138, LEU160 e GLU208 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria dos compostos. Além disso, os resíduos TRP26 e HIS162 realizaram *pi-stacking*, *t-stacking* e cátion-pi, além de realizarem contatos hidrofóbicos com a maioria dos compostos. Os isômeros envolvidos nessas interações foram principalmente EE e ZZ. No entanto, a diferença entre as interações entre os compostos com maior e menor afinidades ocorreu, principalmente, pela diferença na quantidade de contatos hidrofóbicos estabelecidos e quais aminoácidos estão envolvidos.

Por um lado, a molécula que apresentou a menor afinidade *in silico* (JM-11-ZE) foi a única a fazer contato hidrofóbico com o resíduo LEU204 da cruzaina, além de não fazer contato hidrofóbico com alguns resíduos importantes como GLY65 e GLU208. Por outro lado, o ranqueado com maior afinidade fez contatos hidrofóbicos com GLY65, LEU67, MET68, ALA138, LEU160 e GLU208, além de fazer maior quantidade de contatos hidrofóbicos. As interações intermoleculares de LIZ-521-ZE com a cruzaina estão descritas na figura 11.

Figura 11 – Interações intermoleculares entre LIZ-521-ZE e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: As interações entre o isômero ZE do composto LIZ-521 (magenta) e os resíduos da cruzaina, em que os resíduos da cruzaina que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde.

A única diferença de interação entre as duas moléculas com maior afinidade pelo alvo é que a LIZ-521-ZE fez contatos hidrofóbicos com o resíduo SER61 da cruzaina, enquanto a JM-15-ZE não fez contato com esse aminoácido.

4.1.4.1.2 14-alfa demetilase

Ao observar os valores de *score* (ChemPLP) das soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ para a enzima 14-alfa demetilase (tabela 6), observa-se que os compostos em sua conformação EZ possuem uma maior afinidade predita pelo sítio de ligação da enzima 14-alfa demetilase, quando comparado com os outros isômeros.

Tabela 6 – Valores de *score* (ChemPLP) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para 14-alfa demetilase.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	106,88	108,24	97,63	102,26
JM-13*	113,46	-	-	113,88
JM-14	99,72	109,05	105,89	103,89
JM-15	107,21	122,65	112,63	110,92
LIZ-311	103,64	118,97	99,1	110,01
LIZ-321	114,71	123,65	102,28	117,09
LIZ-331	108,28	120,9	110,11	112,68
LIZ-411	107,47	124,32	107,25	111,55
LIZ-421	119,08	124,88	106,18	114,26
LIZ-431	105,45	132,1	105,15	118,7
LIZ-511	102,82	125,03	104,33	109,25
LIZ-521	111,2	125,03	107,04	114,09
LIZ-531	106,2	126,77	105,8	113,89

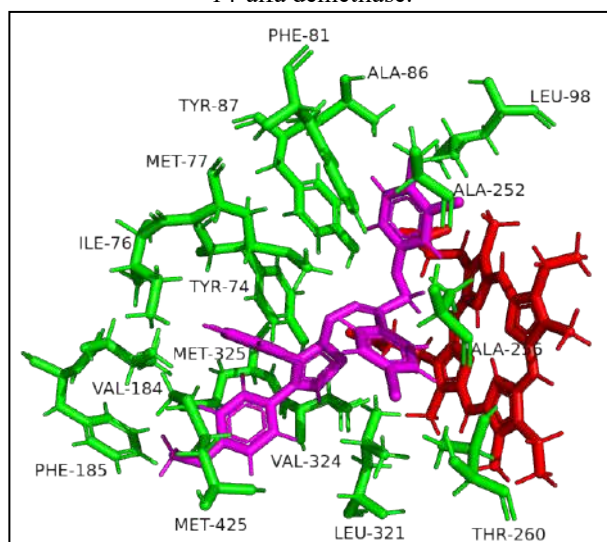
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Houve uma diferença de 34,47 pontos entre a molécula com menor afinidade (97,63 referente a JM-11-ZE) e com maior afinidade (132,1 referente a LIZ-431-EZ). Como para a cruzaina, o composto JM-11 teve dois isômeros entre os 5 piores ranqueados, e o pior ranqueamento foi o mesmo isômero – o ZE. Estruturalmente, o composto LIZ-431 é mais complexo do que o composto JM-11, o que pode favorecer as interações entre o composto e a enzima. As diferenças entre as moléculas LIZ-431 e JM-11 consistem na adição de um átomo de flúor ao primeiro anel benzeno, adição de um átomo de bromo ao segundo anel benzeno, substituição do grupamento metóxi por um anel benzeno ligado ao átomo de nitrogênio do grupo tiazol, e adição um grupamento metóxi ao último anel benzeno da estrutura do composto.

Ao serem analisadas as interações intermoleculares, observa-se que os resíduos TYR74, MET77, PHE81, VAL184, ALA256, LEU321 e MET425 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria das moléculas. Outro componente enzimático extremamente importante na interação ligante-alvo foi o grupamento Heme, presente na enzima. Dentre todos os isômeros de todos os compostos, apenas um não fez algum tipo de contato com esse grupamento, que foi o LIZ-531-ZE. Além disso, principalmente os resíduos TYR74 e HEM443 (grupamento Heme) realizaram *pi-stackings*, *t-stackings*, cátion-pi e ligação de hidrogênio, bem como realizaram contatos hidrofóbicos com a maioria dos compostos. No entanto, a diferença nas interações entre o composto com ranqueamento maior e menor foi devida principalmente pela diferença na quantidade de contatos hidrofóbicos estabelecidos e com quais aminoácidos eles estão interagindo. As interações intermoleculares de LIZ-431-EZ estão descritas na figura 12.

Figura 12 – Interações intermoleculares entre LIZ-431-EZ e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da 14-alfa demetilase.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: As interações entre o isômero ZE do composto LIZ-431-EZ (magenta) e os resíduos da 14-alfa demetilase, em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e o grupamento Heme em vermelho.

Como para a enzima cruzaina, o composto JM-15 (em seu isômero ZE) foi o ranqueado com o valor mais alto da série JM.

4.1.4.1.3 Esqualeno sintase

Ao se observar os valores de *score* (ChemPLP) das soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ para a enzima esqualeno sintase (tabela 7), observa-se que os compostos em sua conformação EE possuem uma maior afinidade predita pelo sítio de ligação da enzima esqualeno sintase, quando comparado com os outros isômeros.

Tabela 7 – Valores de *score* (ChemPLP) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para esqualeno sintase.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	88,32	83,44	88,84	89,01
JM-13*	85,93	-	-	93,07
JM-14	91,97	92,46	93,47	84,18
JM-15	98,81	97,71	90,94	91,75
LIZ-311	103,32	96,28	96,11	90,04
LIZ-321	98,13	91,19	96,96	95,58
LIZ-331	93,91	98,57	94,31	91,54
LIZ-411	96,57	97,12	86,88	94
LIZ-421	95,12	100,28	97,28	97,34
LIZ-431	100,94	91,22	94,16	95,52
LIZ-511	98,17	95,59	92,09	93,34
LIZ-521	103,57	94,35	83,34	95,72
LIZ-531	96,87	94,66	92,35	92,75

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

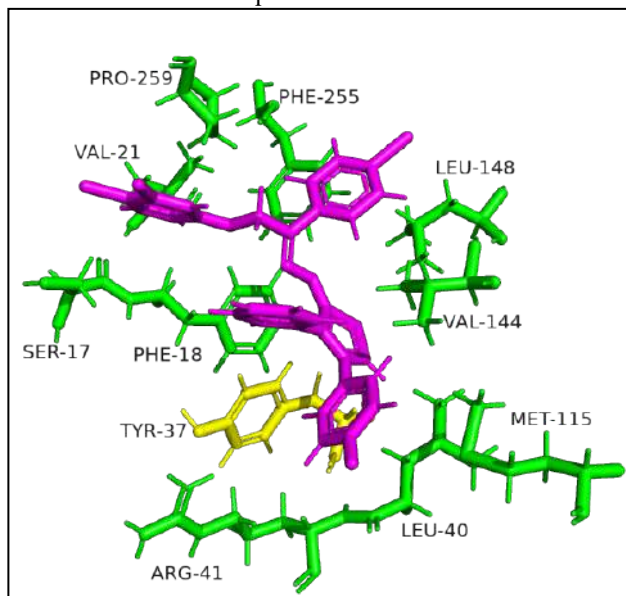
Houve uma diferença de 20,23 pontos entre a menor (83,34 referente a LIZ-521-ZE) e a maior afinidade (103,57 referente a LIZ-521-EE). Interessantemente, foram diferentes isômeros da mesma molécula que apresentaram a afinidade *in silico* mais alta e mais baixa por esta enzima.

Ao se analisar as interações intermoleculares, observa-se que os resíduos PHE18, TYR37, VAL144, LEU148, LEU176, PHE255 e PRO259 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria dos compostos. Além disso, o resíduo TYR37 realizou *t-stacking* e ligação de hidrogênio com muitos compostos, bem como o resíduo TYR152 esteve envolvido na maioria das ligações de hidrogênio. No entanto, a diferença entre as interações entre o composto de maior e menor ranqueamento ocorreu principalmente pela diferença na quantidade de contatos hidrofóbicos estabelecidos e os respectivos aminoácidos

envolvidos, além da molécula LIZ-521-EE ter realizado *t-stacking* com o resíduo TYR37 da enzima (figura 13).

Assim como para as enzimas cruzaina e 14 alfa-demetilase, o composto JM-15 foi o que apresentou o melhor ranqueamento da série JM.

Figura 13 – Interações intermoleculares entre LIZ-521-EE e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da esqualeno sintase.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: As interações entre o isômero ZE do composto LIZ-521 (magenta) e os resíduos da esqualeno sintase, em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e resíduo que faz *t-stacking* está em amarelo.

4.1.4.1.4 *Tripanotiona redutase*

Ao serem observados os valores de *score* (ChemPLP) das soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ para a enzima tripanotiona redutase (tabela 8), observa-se que os compostos em sua configuração (ou estereoquímica) EZ possuem uma maior afinidade predita pelo sítio de ligação da enzima tripanotiona redutase, quando comparados com os outros isômeros.

Tabela 8 – Valores de *score* (ChemPLP) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para tripanotiona redutase.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	73,79	75,17	82,07	65,79
JM-13*	84,72	-	-	82,23
JM-14	65,09	74,89	66,81	73,23
JM-15	75,72	72,59	72,45	74,68
LIZ-311	69,95	73,63	81,88	69,65
LIZ-321	76,15	75,3	73,36	69,25
LIZ-331	67,08	77,32	77,25	72,71
LIZ-411	70,3	80,37	84,3	69,59
LIZ-421	74,36	73,05	70,5	76,39
LIZ-431	70,02	77,29	75,22	83,06
LIZ-511	70,11	80,33	76,61	71,08
LIZ-521	73,49	79,99	73,69	76,58
LIZ-531	73,79	75,6	75,97	76,77

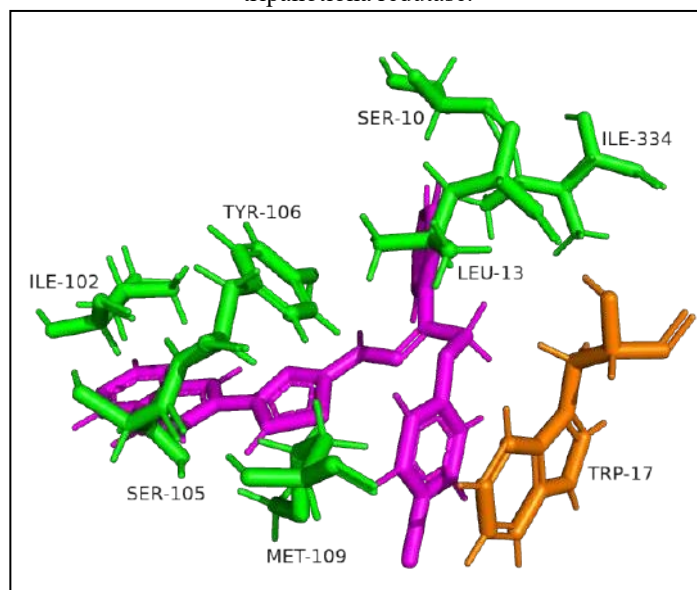
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Houve uma diferença de 19,63 pontos entre a molécula de menor (65,09 referente a JM-14-EE) e maior afinidade (84,72 referente a JM-13-E). Interessantemente, novamente observa-se que foram isômeros diferentes da mesma molécula.

seAo serem analisadas as interações intermoleculares, observa-se que os resíduos LEU13, GLU14, TRP17, TYR106 e MET109 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria dos compostos. Além disso, os resíduos TRP17 e TYR106 realizaram t- e pi-*stacking*, além de ligação de hidrogênio, com muitos compostos. A diferença das interações entre o composto com maior e menor ranqueamento ocorreu principalmente porque JM-13-E teve interações pi-*stackings* com os anéis do aminoácido TRP17, enquanto JM-14-EE fez apenas um pi-*stacking*. As interações intermoleculares entre JM-13-E e a enzima tripanotiona redutase estão expostas na figura 14.

Figura 14 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da tripanotiona redutase.



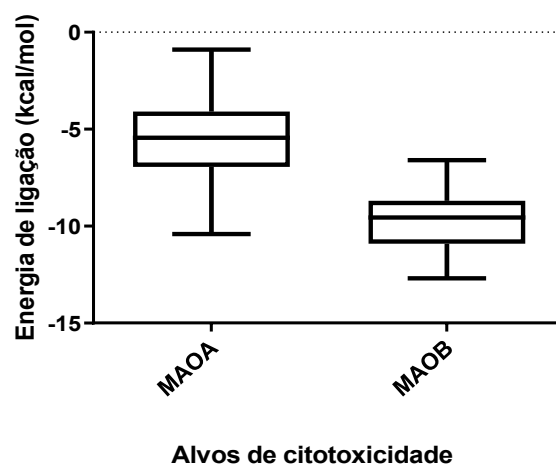
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: As interações entre o isômero E do composto JM-13 (magenta) e os resíduos da tripanotiona redutase, em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e resíduo que faz *pi-stacking* está em laranja.

4.1.4.2 Citotoxicidade

O gráfico 4 traz a análise panorâmica dos resultados de *docking* referente aos alvos de citotoxicidade. Os resultados gerados pelo Autodock Vina são fornecidos em kcal/mol. Quanto menor a energia de ligação, maior a finidade predita pelo alvo. É possível verificar que os compostos demonstraram maior afinidade *in silico* pela monoamina oxidase B (MAOB). Não houve presença de *outliers* em nenhum dos alvos.

Gráfico 4 – Variação dos valores de energia de ligação (kcal/mol) para cada alvo de toxicidade.

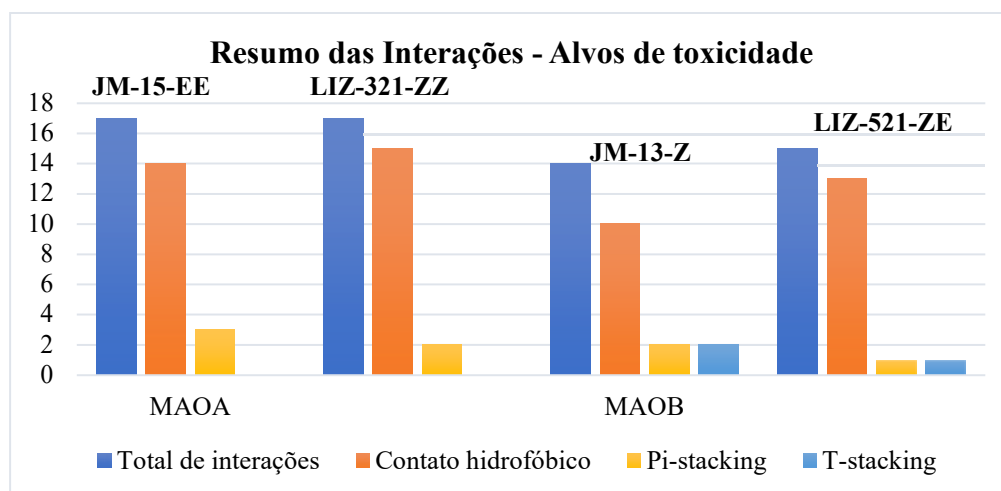


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: MAOA = Monoamina oxidase A; MAOB = Monoamina oxidase B.

Além da análise geral de energias de ligação, também é interessante fazer uma análise geral das interações intermoleculares. No gráfico 5, o primeiro set de resultados (barras) é relativo ao composto (e seu isômero) melhor ranqueado, enquanto o segundo é relativo ao pior ranqueado. No caso de MAOA, as interações *pi-stacking* foram responsáveis por diferenciar o melhor do pior ranqueado, enquanto para MAOB tanto *pi*-quanto *t-stacking* auxiliaram na diferenciação.

Gráfico 5 – Resumo das interações intermoleculares entre os compostos e os alvos de toxicidade.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A seguir estão descritos os valores de energia de ligação de cada ligante em cada alvo de citotoxicidade analisado, bem como suas interações intermoleculares de maneira mais descritiva.

Ao serem observados os valores de energia de ligação (kcal/mol) das soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ para a enzima MAOA (tabela 9), os compostos em sua configuração (ou estereoquímica) EE possuem uma maior afinidade predita pelo sítio de ligação da enzima, quando comparados com os outros isômeros.

Houve uma diferença de 9,5 kcal/mol entre a molécula de menor (-0,9 kcal/mol referente a LIZ-321-ZZ) e maior afinidade (-10,4 kcal/mol referente a JM-15-EE). Ambos isômeros do composto JM-13, em que as plataformas ProTox-II e SEA citaram como possível alvo as enzimas da família MAO, ficaram entre os 10 melhores ranqueados. O isômero Z desse composto foi o quarto melhor ranqueado (-8,5 kcal/mol) enquanto o isômero E foi o oitavo colocado (-8 kcal/mol).

Tabela 9 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para MAOA.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-8,1	-6,4	-8,9	-7,5
JM-13*	-8	-	-	-8,5
JM-14	-7,5	-8,3	-8,2	-5,2
JM-15	-10,4	-8	-6,9	-10,3
LIZ-311	-5	-5,5	-5,6	-5,5
LIZ-321	-5,2	-4,5	-6,1	-0,9
LIZ-331	-5,1	-4,1	-5,8	-2,1
LIZ-411	-5,9	-4,3	-4,1	-2,1
LIZ-421	-5,6	-6,8	-1,7	-1,7
LIZ-431	-5,2	-4,5	-3	-3,8
LIZ-511	-5,7	-4,4	-4,1	-5,4
LIZ-521	-5,8	-4,4	-1,7	-2,7
LIZ-531	-7,1	-4,2	-5,8	-2,2

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

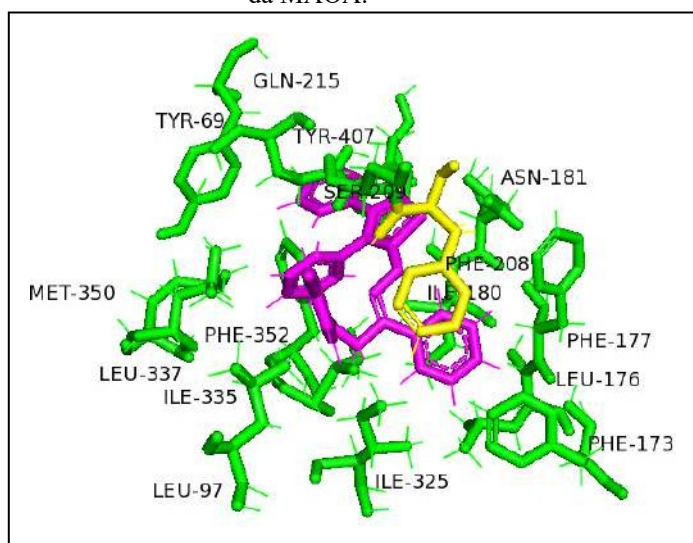
Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Ao serem analisadas as interações intermoleculares, observa-se que os resíduos TYR69, LEU97, ILE180, GLN215, ILE325, ILE335, LEU337 e MET350 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria dos compostos. Além disso, os resíduos PHE208, PHE352, TYR407 e TYR444 fizeram contatos hidrofóbicos, *t*- e *pi-stacking* com a

maioria das soluções. O resíduo VAL210, além de fazer contatos hidrofóbicos com a maioria das soluções, fez ligações de hidrogênio com 4 soluções.

A diferença das interações entre o composto com maior e menor ranqueamento ocorreu principalmente porque JM-15-EE teve interações *t-stacking* com PHE208, enquanto LIZ-521-ZZ fez apenas contatos hidrofóbicos com todos os resíduos. Na figura 15 podemos ver as principais interações de JM-15-EE com os resíduos do sítio de ligação da MAOA.

Figura 15 – Interações intermoleculares entre JM-15-EE e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação da MAOA.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: As interações entre o isômero EE do composto JM-15 (magenta) e os resíduos da monoamina oxidase A, em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e resíduo que faz *t-stacking* está em amarelo.

Ao serem observados os valores de energia de ligação (kcal/mol) das soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ para a enzima MAOB (tabela 10), os compostos em sua configuração (ou estereoquímica) EE possuem uma maior afinidade predita pelo sítio de ligação da enzima, quando comparados com os outros isômeros.

Tabela 10 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para MAOB.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-11,4	-11	-11,6	-11,8
JM-13*	-12,4	-	-	-12,7
JM-14	-11	-11,2	-10,9	-11
JM-15	-8,3	-10,2	-10,7	-9,9
LIZ-311	-8	-10,8	-8,7	-9,1
LIZ-321	-9,1	-10,9	-9	-9,6
LIZ-331	-9,1	-8,5	-8,4	-9
LIZ-411	-8,7	-11	-9,6	-10,1
LIZ-421	-9,2	-10,9	-10,3	-10,3
LIZ-431	-9,3	-8,4	-9,3	-9,4
LIZ-511	-7,8	-9,7	-9,5	-9,6
LIZ-521	-8,3	-9,5	-6,6	-9,9
LIZ-531	-7,9	-7,6	-8,7	-7,7

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

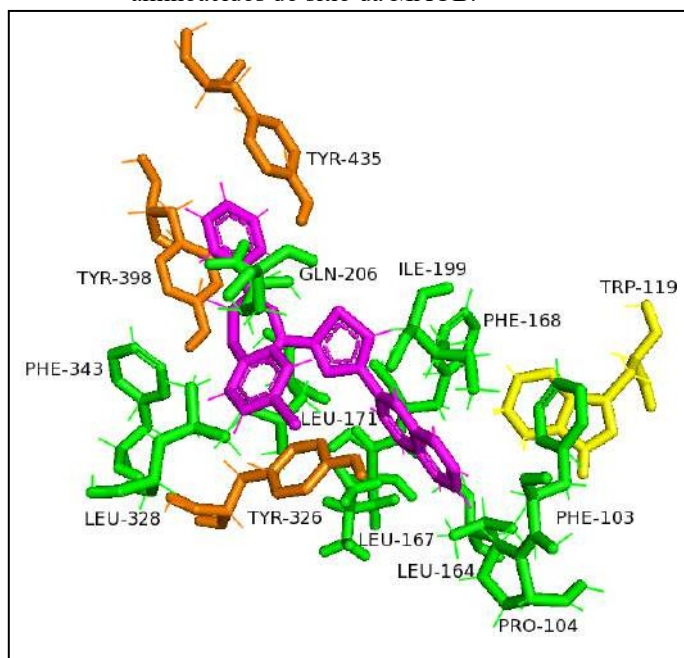
Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Houve uma diferença de 6,1 kcal/mol entre a molécula de menor (-6,6 kcal/mol referente a LIZ-521-ZE) e maior afinidade (-12,7 kcal/mol referente a JM-13-Z). Ambos isômeros do composto JM-13, em que as plataformas ProTox-II e SEA citaram como possível alvo as enzimas da família MAO, foram os melhores ranqueados. O isômero Z desse composto foi o primeiro melhor ranqueado (-12,7 kcal/mol), enquanto o isômero E foi o segundo colocado (-12,4 kcal/mol).

Ao serem analisadas as interações intermoleculares, verificou-se que os resíduos TYR69, LEU97, ILE180, GLN215, ILE325, ILE335, LEU337 e MET350 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria dos compostos. Além de contatos hidrofóbicos com a maioria das soluções, os resíduos PHE168, GLN206 e TYR435 fizeram *t-stacking*, ligação de hidrogênio e *pi-stacking*, respectivamente, com algumas soluções. Os resíduos TYR326 e TYR398 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria das soluções, além de também fazerem *pi-* e *t-stacking*.

A diferença das interações entre o composto com maior e menor ranqueamento ocorreu principalmente porque JM-13-Z fez *pi-* ou *t-stacking* com TRP119, TYR326, TYR398 e TYR435, enquanto LIZ-521-ZE fez interações *pi-* ou *t-stacking* com TYR326 e 435. Na figura 16 é possível observarmos as principais interações de JM-13-Z.

Figura 16 – Interações intermoleculares que ocorrem entre o composto JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio da MAOB.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

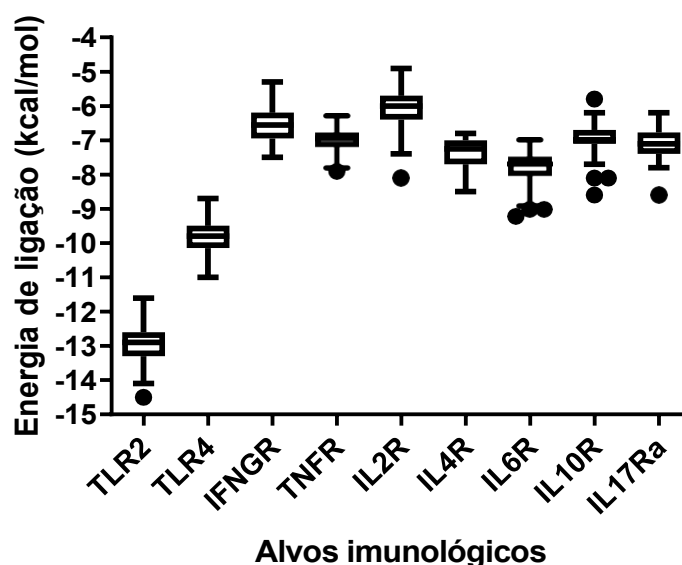
Legenda: As interações entre o isômero Z do composto JM-13 (magenta) e os resíduos da monoamina oxidase B, em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde, o resíduo que faz *t-stacking* está em amarelo e os resíduos que fazem *pi-stacking* estão em laranja.

4.1.4.3 Sistema imune

Devido ao grande número de alvos imunológicos investigados, fez-se necessário efetuar uma análise panorâmica inicial dos resultados. No gráfico 6 está exposta a variação de energia de ligação (kcal/mol) entre os 9 diferentes alvos imunológicos. A partir da análise do gráfico 6, é possível verificar que TLR2 foi o alvo que apresentou os menores valores de energia de ligação, seguido por TLR4. O composto com a maior afinidade predita para o TLR2 foi LIZ-421-EE, enquanto para TLR4 foi JM-13-Z. Houve variações semelhantes nos valores de energia de ligação entre os receptores de citocinas.

É interessante destacar que para TNFR e IL10R houve pouca diferença de energia de ligação média entre os ligantes testados, ou seja, a maioria tem afinidades semelhantes pelo alvo. O receptor de citocina que apresentou menor valor de energia de ligação média foi IL6R, com destaque para JM-13-Z que teve energia de ligação de -9,2 kcal/mol.

Gráfico 6 – Variação dos valores de energia de ligação (kcal/mol) para cada alvo do sistema imune.

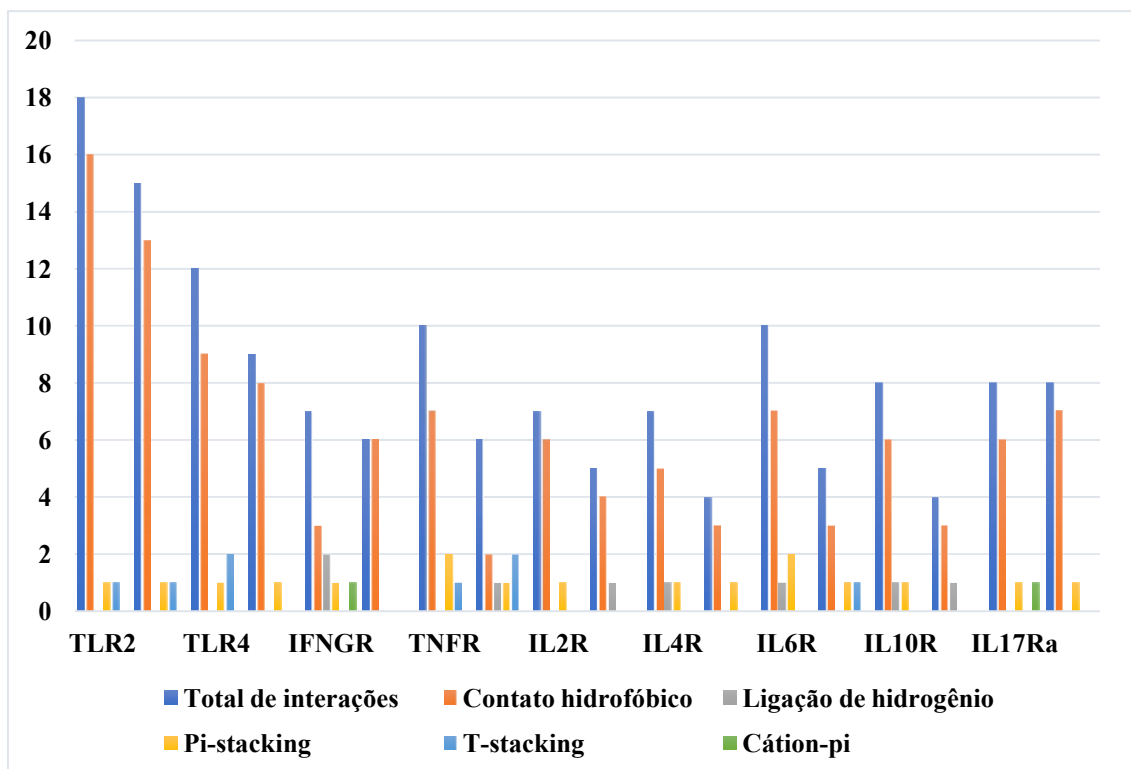


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: TLR2 = receptor *toll-like* 2; TLR4 = receptor *toll-like* 4; IFNGR = receptor do interferon gama; TNFR = receptor 2 do fator de necrose tumoral; IL2R = receptor da interleucina 2; IL4R = receptor da interleucina 4; IL6R = receptor da interleucina 6; IL10R = receptor da interleucina 10; IL17Ra = receptor A da interleucina 17.

Além da análise geral de energias de ligação, também é interessante fazer uma análise geral das interações intermoleculares. No gráfico 7, o primeiro *set* de resultados (barras) é relativo ao composto (e seu isômero) melhor ranqueado, enquanto o segundo é relativo ao pior ranqueado. É possível verificar que TLR2 e TLR4 foram os alvos em que houve o maior número de interações. No geral, contato hidrofóbico foi a interação que melhor diferenciou o melhor ranqueado do pior ranqueado.

Gráfico 7 – Resumo das interações intermoleculares entre os compostos e os alvos imunológicos.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: TLR2 = receptor *toll-like* 2; TLR4 = receptor *toll-like* 4; IFNGR = receptor do interferon gama; TNFR = receptor 2 do fator de necrose tumoral; IL2R = receptor da interleucina 2; IL4R = receptor da interleucina 4, IL6R = receptor da interleucina 6, IL10R = receptor da interleucina 10; IL17Ra = receptor A da interleucina 17.

A seguir estão descritos os valores de energia de ligação de cada ligante em cada alvo analisado, bem como suas interações intermoleculares de maneira mais descritiva.

4.1.4.3.1 Receptor *toll-like* 2 (TLR2)

Ao observar os resultados de *docking* para o TLR2 (tabela 11), foi possível verificar que houve uma diferença de 2,9 kcal/mol entre LIZ-421-EE (-14,5 kcal/mol) e JM-14-ZZ (-11,6 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o EE.

Tabela 11 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para TLR2.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-13	-12,9	-12,7	-11,9
JM-13*	-13,2	-	-	-13,5
JM-14	-11,8	-12,7	-13,1	-11,6
JM-15	-13,4	-13,1	-13,3	-12,6
LIZ-311	-13,1	-12,6	-12	-12,7
LIZ-321	-13,4	-12,9	-12,4	-12,9
LIZ-331	-12,8	-12,6	-12	-12,5
LIZ-411	-14,1	-12,6	-12,6	-13,3
LIZ-421	-14,5	-12,9	-13,4	-13,4
LIZ-431	-13,7	-13	-12,4	-13,1
LIZ-511	-13,8	-13,2	-12,7	-13,3
LIZ-521	-14,1	-12,6	-13,1	-13,6
LIZ-531	-12,9	-12,7	-12,5	-13

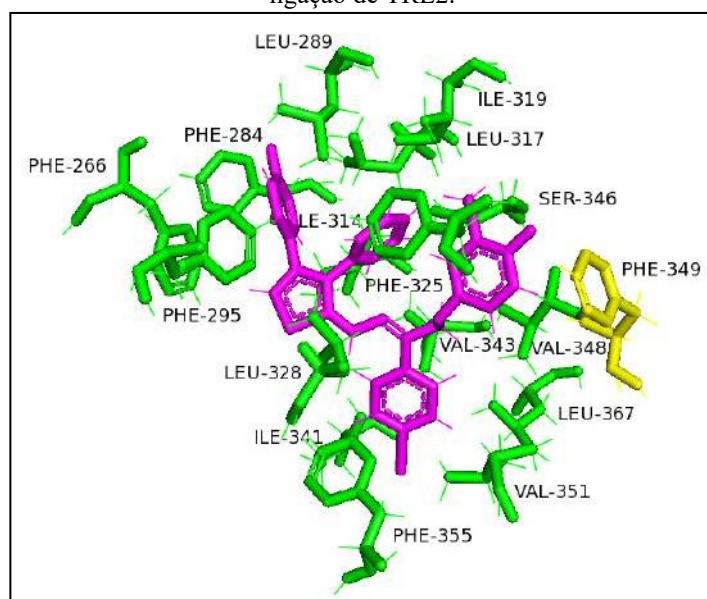
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analizando as interações intermoleculares, foi possível verificar que o resíduo PHE266 interagiu com todos os ligantes e seus isômeros, tanto fazendo contatos hidrofóbicos quanto *t-stacking*. Além disso, os resíduos PHE284, ILE114, ILE119, PHE325, VAL343, VAL348 e PHE355 fizeram interações com a maioria dos compostos. O resíduo PHE284 fez *t-* e *pi-stacking* com diferentes compostos. Já o resíduo PHE325 fez *pi-stacking* com a maioria dos compostos que ele interagiu. O resíduo PHE349 fez *pi-stacking* e ligações de hidrogênio com alguns compostos.

A principal diferença de interação entre o melhor ranqueado (LIZ-421-EE) e o pior ranqueado (JM-14-ZZ) está principalmente no número menor de contatos hidrofóbicos feitos pelo pior ranqueado. Na figura 17 é possível observar as principais interações entre LIZ-421-EE e o TLR2.

Figura 17 – Interações intermoleculares entre LIZ-421-EE e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de TLR2.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: As interações entre o isômero EE do composto LIZ-421-EE (magenta) e os resíduos do TLR2, em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e o resíduo que faz *t-stacking* está em amarelo.

4.1.4.3.2 Receptor toll-like 4 (TLR4)

Ao observar os resultados de *docking* para o TLR4 (tabela 12), foi possível verificar que houve uma diferença de 2,3 kcal/mol entre JM-13-Z (-11 kcal/mol) e LIZ-531-ZE (-8,7 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o EZ.

Tabela 12 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para TLR4.

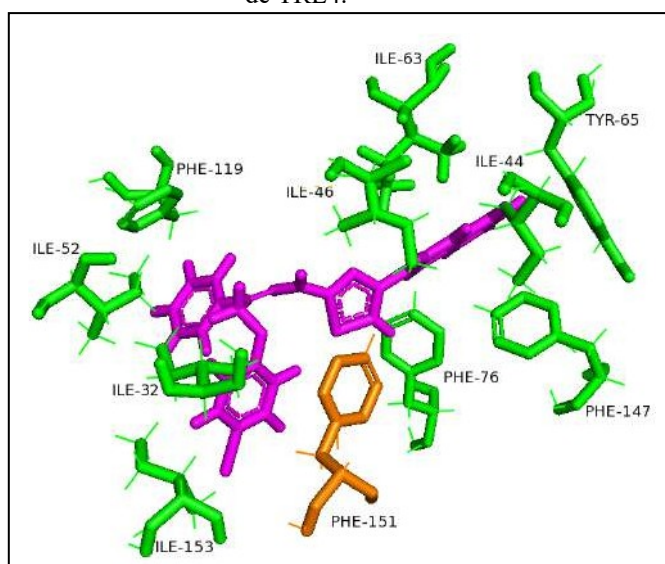
Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-10,4	-10,5	-9,9	-9,8
JM-13*	-10,8	-	-	-11
JM-14	-9,7	-9,2	-9,6	-9,7
JM-15	-9,1	-10,1	-9,5	-9,8
LIZ-311	-9,7	-9,8	-9,1	-9,4
LIZ-321	-10	-9,8	-9	-9,5
LIZ-331	-9,8	-9,4	-8,7	-9,3
LIZ-411	-10,1	-10,5	-9,7	-9,8
LIZ-421	-10,3	-10,8	-9,6	-9,6
LIZ-431	-10	-10,6	-9,3	-9,7
LIZ-511	-10,1	-10,3	-10	-9,7
LIZ-521	-10,3	-10,4	-9,9	-9,9
LIZ-531	-10	-10,3	-8,7	-9,3

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que os resíduos ILE-52, LEU61, LEU63, PHE151 e ILE-153 interagiram com a maioria das soluções. Além disso, os resíduos PHE104, PHE121 e PHE151 fizeram *pi* ou *t-stacking* com um grande número de soluções. A principal diferença de interação entre o melhor ranqueado (JM-13-Z) e o pior ranqueado (LIZ-531-ZE) está no número maior de contatos hidrofóbicos feitos pelo melhor ranqueado, além de JM-13-Z fazer *pi-stacking* com o resíduo PHE151. Na figura 18 é possível observar as principais interações entre JM-13-Z e o TLR4.

Figura 18 – Interações intermoleculares entre JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de TRL4.



Legenda: As interações entre o isômero Z do composto JM-13 (magenta) e os resíduos do TLR4, em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e o resíduo que faz *pi-stacking* está em laranja.

4.1.4.3.3 Receptor do interferon gama (IFNGR)

Ao observar os resultados de *docking* para o IFNGR (tabela 13), foi possível verificar que houve uma diferença de 2,2 kcal/mol entre JM-13-E (-7,5 kcal/mol) e JM-11-ZZ (-5,3 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o EZ.

Tabela 13 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IFNGR.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-10,4	-10,5	-9,9	-9,8
JM-13*	-10,8	-	-	-11
JM-14	-9,7	-9,2	-9,6	-9,7
JM-15	-9,1	-10,1	-9,5	-9,8
LIZ-311	-9,7	-9,8	-9,1	-9,4
LIZ-321	-10	-9,8	-9	-9,5
LIZ-331	-9,8	-9,4	-8,7	-9,3
LIZ-411	-10,1	-10,5	-9,7	-9,8
LIZ-421	-10,3	-10,8	-9,6	-9,6
LIZ-431	-10	-10,6	-9,3	-9,7
LIZ-511	-10,1	-10,3	-10	-9,7
LIZ-521	-10,3	-10,4	-9,9	-9,9
LIZ-531	-10	-10,3	-8,7	-9,3

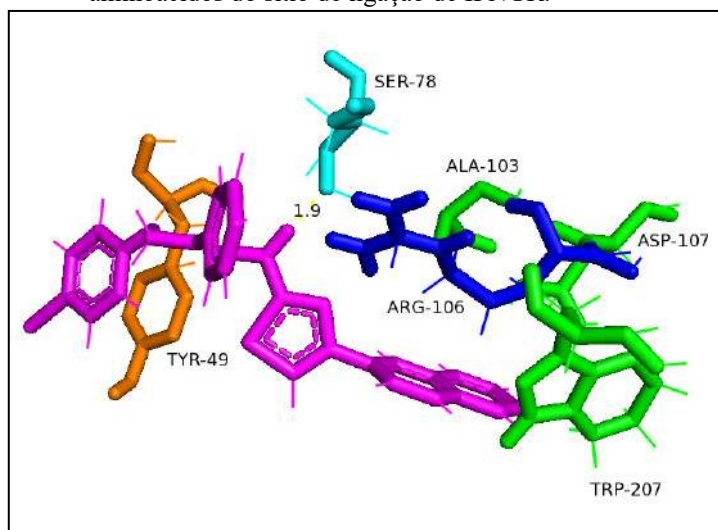
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que TYR49 fez *pi*- e *t-stacking*, além de contatos hidrofóbicos, com a maioria dos isômeros, parecendo ser um resíduo-chave da interface composto-sítio de ligação. Os aminoácidos SER80 e TRP82 fizeram ligação de hidrogênio e contatos hidrofóbicos (além de *pi* e *t-stacking* no caso de TRP82). Os resíduos ASN79, VAL206 e TRP207 também fizeram contatos hidrofóbicos com boa parte dos isômeros. Além disso, TRP207 também participou de *t-stacking* e ligações de hidrogênio. O aminoácido ARG106 parece ser importante na formação de cátion-*pi*, além de ligações de hidrogênio.

Observando a figura 19 é possível verificar que o melhor ranqueado (JM-13-E) fez *pi-stacking* com TYR49, ligação de hidrogênio com SER78 e cátion-*pi* com ARG106. Já o pior ranqueado (JM-11-ZZ) fez apenas contatos hidrofóbicos com todos os resíduos com os quais interagiu.

Figura 19 – Interações intermoleculares que ocorrem entre o composto JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IFNGR.



Legenda: As interações entre o isômero E do composto JM-13 (magenta) e os resíduos de IFNGR em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde, o resíduo que faz *pi-stacking* está em laranja, o resíduo que faz cátion-pi está em azul e o resíduo que faz ligação de hidrogênio (com a distância em angstrom entre os átomos envolvidos na ligação) está em ciano.

4.1.4.3.4 Receptor do fator de necrose tumoral (TNFR)

Ao observar os resultados de *docking* para o TNFR (tabela 14), foi possível verificar que houve uma diferença de 1,6 kcal/mol entre JM-15-EZ (-7,9 kcal/mol) e LIZ-511-ZE (-6,3 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o EE.

Tabela 14 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para TNFR.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-6,8	-6,9	-7,2	-6,8
JM-13*	-7,7	-	-	-7,2
JM-14	-7	-6,9	-7,2	-6,6
JM-15	-7,8	-7,9	-7,6	-6,5
LIZ-311	-7,5	-6,9	-6,8	-6,9
LIZ-321	-7,6	-7	-7,1	-6,7
LIZ-331	-7,2	-6,9	-6,9	-6,7
LIZ-411	-6,9	-7,1	-7,2	-6,6
LIZ-421	-7,4	-6,9	-6,7	-6,7
LIZ-431	-7,2	-6,7	-7,2	-7,2
LIZ-511	-6,7	-6,9	-6,3	-6,5
LIZ-521	-7	-7	-7,2	-6,7
LIZ-531	-7	-6,8	-7,1	-7,1

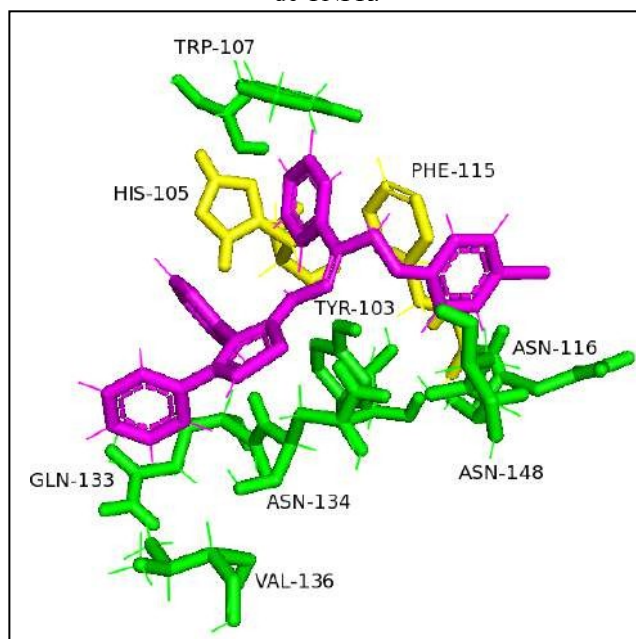
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que os resíduos ASN134 e ASN148 fizeram contatos hidrofóbicos com a maior parte dos compostos, com destaque para o primeiro resíduo que também fez ligações de hidrogênio com 24 isômeros. Os resíduos HIS105 e PHE115, além de fazerem contatos hidrofóbicos com a maioria das soluções, também fizeram *pi*- e *t-stacking* com um grande número de isômeros.

A principal diferença de interação entre o melhor ranqueado (JM-15-EZ) e o pior ranqueado (LIZ-511-ZE) foi que JM-15-EZ fez contatos hidrofóbicos com um maior número de resíduos, além de fazer *t-stacking* com os resíduos HIS105 e PHE115. Na figura 20 é possível verificar o posicionamento de JM-15-EZ no sítio de ligação do TNFR e suas principais interações.

Figura 20 – Interações intermoleculares entre JM-15-EZ e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de TNFR.



Legenda: As interações entre o isômero EZ do composto JM-15 (magenta) e os resíduos de TNFR em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e os resíduos que fazem *t-stacking* estão em amarelo.

4.1.4.3.5 Receptor da interleucina 2 (IL2R)

Ao observar os resultados de *docking* para o IL2R (tabela 15), foi possível verificar que houve uma diferença de 3,2 kcal/mol entre JM-13-E (-8,1 kcal/mol) e LIZ-531-ZZ (-4,9 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o EE. Importante observar que os dois melhores ranqueados foram isômeros do mesmo composto, com diferença de 0,7 kcal entre ambos, mostrando a importância da isomeria para esse alvo.

Tabela 15 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL2R.

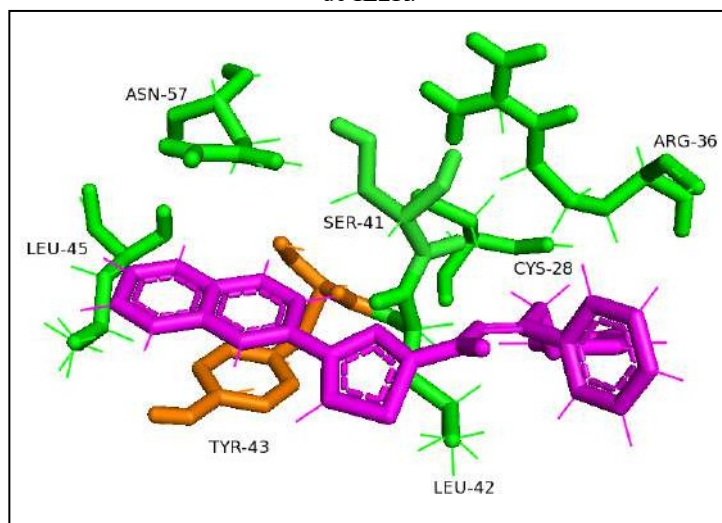
Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-6,3	-5,5	-6	-5,6
JM-13*	-8,1	-	-	-7,4
JM-14	-6,5	-6	-5,3	-6
JM-15	-5,5	-6,7	-5,5	-6
LIZ-311	-5,8	-5,6	-5,6	-5,2
LIZ-321	-6	-6,1	-5,7	-5,9
LIZ-331	-6	-6,4	-6,1	-5,9
LIZ-411	-6,9	-6,6	-6	-7
LIZ-421	-6,7	-6,4	-5,7	-5,7
LIZ-431	-5,9	-6,4	-6,6	-5,9
LIZ-511	-5,8	-7,3	-5,9	-5,5
LIZ-521	-5,9	-6,5	-5,6	-5,7
LIZ-531	-6	-6,4	-5,8	-4,9

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que os resíduos que fizeram contatos hidrofóbicos, cátion-pi, ligações de hidrogênio ou *pi-stacking* com a maior parte das soluções foram ARG35 e ARG36, LYS38, SER41, LEU42 e TYR43. O resíduo TYR43 aparenta ser um bom formador de *pi-stacking*, enquanto ARG35 um bom formador de cátion-pi e LEU42 de ligações de hidrogênio. O número de contatos hidrofóbicos foi a principal responsável por diferenciar o melhor ranqueado (JM-13-E) do pior ranqueado (LIZ-531-ZZ), além de JM-13-E fazer *pi-stacking* com o resíduo TYR43. Na figura 21 é possível observarmos o posicionamento de JM-13-E no sítio de ligação com IL2R e suas principais interações.

Figura 21 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL2R.



Legenda: As interações entre o isômero E do composto JM-13 (magenta) e os resíduos de IL2R em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde e o resíduo que faz *pi-stacking* está em laranja.

4.1.4.3.6 Receptor da interleucina 4 (IL4R)

Ao observar os resultados de *docking* para o IL2R (tabela 16), foi possível verificar que houve uma diferença de 1,7 kcal/mol entre JM-13-E (-8,5 kcal/mol) e LIZ-531-ZE (-6,8 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o ZZ.

Tabela 16 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL4R.

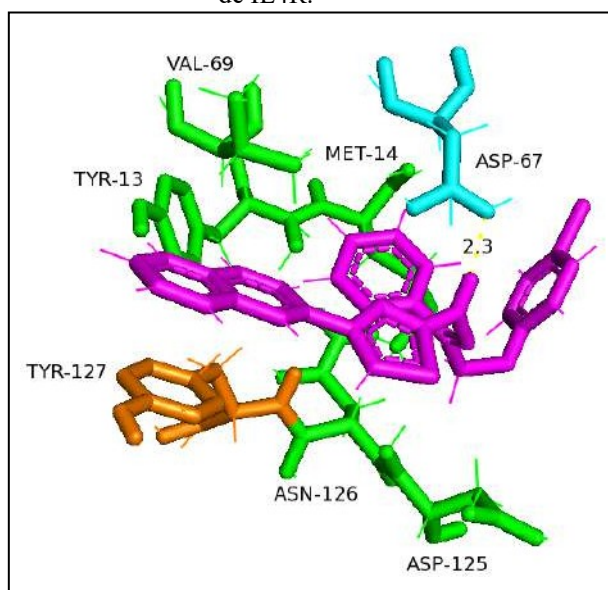
Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-7,4	-7,6	-7,7	-7,8
JM-13*	-8,5	-	-	-7,5
JM-14	-7,1	-7,7	-7,6	-7,7
JM-15	-6,9	-6,8	-6,8	-7,3
LIZ-311	-7,1	-7	-7,1	-7,7
LIZ-321	-7,1	-7,1	-7	-7,9
LIZ-331	-6,8	-6,9	-6,9	-7,7
LIZ-411	-7,2	-7	-7,2	-7,8
LIZ-421	-7,2	-6,9	-7,8	-7,8
LIZ-431	-6,8	-7,1	-7,1	-7,3
LIZ-511	-7,3	-7,3	-7	-7,5
LIZ-521	-7,3	-7,3	-7,9	-7,9
LIZ-531	-7,1	-7	-6,8	-7,7

Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que os resíduos ASP67, VAL69, ASP125 E ASN126 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria dos isômeros. O resíduo TYR127 parece ser bastante importante para esse alvo, pois fez *pi* e *t-stacking*, além de ligação de hidrogênio com a maior parte das soluções. Mais especificamente, todas as vezes que TYR127 fez interação com algum isômero ele fez algumas dessas interações previamente citadas. O número de contatos hidrofóbicos, além de fazer uma ligação de hidrogênio com o resíduo ASP67, foram as responsáveis por diferenciar o melhor (JM-13-E) do pior ranqueado (LIZ-531-ZE). Na figura 22 é possível verificar o posicionamento de JM-13-E no sítio de ligação ao IL4R.

Figura 22 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL4R.



Legenda: As interações entre o isômero E do composto JM-13 (magenta) e os resíduos de IL4R em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde, o resíduo que faz *pi-stacking* está em laranja e o resíduo que faz ligação de hidrogênio (com a distância em angstrom entre os átomos envolvidos na ligação) está em ciano.

4.1.4.3.7 Receptor da interleucina 6 (IL6R)

Ao observar os resultados de *docking* para o IL6R (tabela 17), foi possível verificar que houve uma diferença de 2,2 kcal/mol entre JM-13-Z (-9,2 kcal/mol) e JM-14-ZZ (-7 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o EE.

Tabela 17 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL6R.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-7,5	-7,5	-7,8	-7,6
JM-13*	-8,6			-9,2
JM-14	-7,3	-7,9	-7,7	-7
JM-15	-7,5	-7,5	-8	-7,4
LIZ-311	-7,5	-7,5	-7,8	-9
LIZ-321	-7,3	-8,2	-8	-7,5
LIZ-331	-7,3	-8	-7,5	-7,3
LIZ-411	-8,7	-8,2	-8,3	-7,5
LIZ-421	-9	-8,2	-7,7	-7,7
LIZ-431	-7,4	-7,7	-7,3	-8,2
LIZ-511	-8,8	-8	-7,6	-7,4
LIZ-521	-8,9	-7,7	-8	-7,5
LIZ-531	-7,4	-7,7	-7,4	-7,3

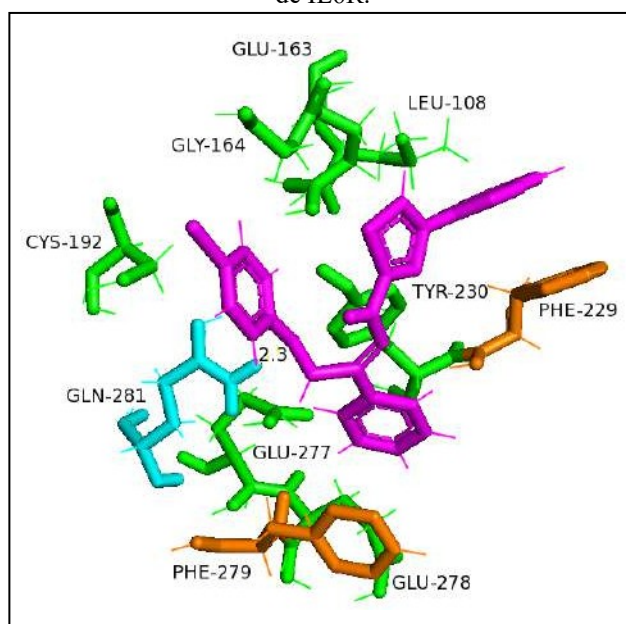
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que os resíduos GLU163 e GLU278 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria das soluções. Os resíduos PHE229, TYR230 e PHE279 fizeram contatos hidrofóbicos, *t* e *pi-stacking*, além de ligações de hidrogênios com a maioria das soluções, tendo os 2 últimos interagido com todas as soluções.

O número de contatos hidrofóbicos feitos pelo melhor ranqueado (JM-13-Z) foi o principal fator que auxiliou a diferenciá-lo do pior ranqueado (JM-14-ZZ). Vale ressaltar que JM-13-Z fez *pi-stacking* com o resíduo PHE229, enquanto JM-14-ZZ fez *t-stacking* com esse resíduo. Além disso, JM-13-Z fez uma ligação de hidrogênio com o resíduo GLN281, enquanto JM-14-ZZ não interagiu com esse resíduo. Na figura 23 é possível observarmos o posicionamento de JM-13-Z no sítio de ligação com IL6R e suas principais interações intermoleculares.

Figura 23 – Interações intermoleculares entre JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL6R.



Legenda: As interações entre o isômero Z do composto JM-13 (magenta) e os resíduos de IL6R em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde, os resíduos que fazem *pi-stacking* estão em laranja e o resíduo que faz ligação de hidrogênio (com a distância em angstrom entre os átomos envolvidos na ligação) está em ciano.

4.1.4.3.8 Receptor da interleucina 10 (IL10R)

Ao observar os resultados de *docking* para o IL10R (tabela 18), foi possível verificar que houve uma diferença de 2,8 kcal/mol entre JM-13-E (-8,6 kcal/mol) e LIZ-521-ZE (-5,8 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o EZ.

Tabela 18 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL10R.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-7	-7,7	-7,1	-6,8
JM-13*	-8,6			-8,1
JM-14	-7	-7	-6,8	-6,8
JM-15	-6,7	-8,1	-7,4	-6,4
LIZ-311	-7,1	-7	-7,1	-6,5
LIZ-321	-7	-6,7	-7,2	-6,9
LIZ-331	-6,5	-7	-6,7	-6,7
LIZ-411	-7,5	-6,4	-6,2	-7,2
LIZ-421	-7,5	-6,5	-7	-7
LIZ-431	-7,1	-6,7	-7	-6,7
LIZ-511	-7,2	-6,8	-6,9	-6,7
LIZ-521	-7,1	-7	-5,8	-6,8

LIZ-531	-7	-6,9	-6,5	-6,5
---------	----	------	------	------

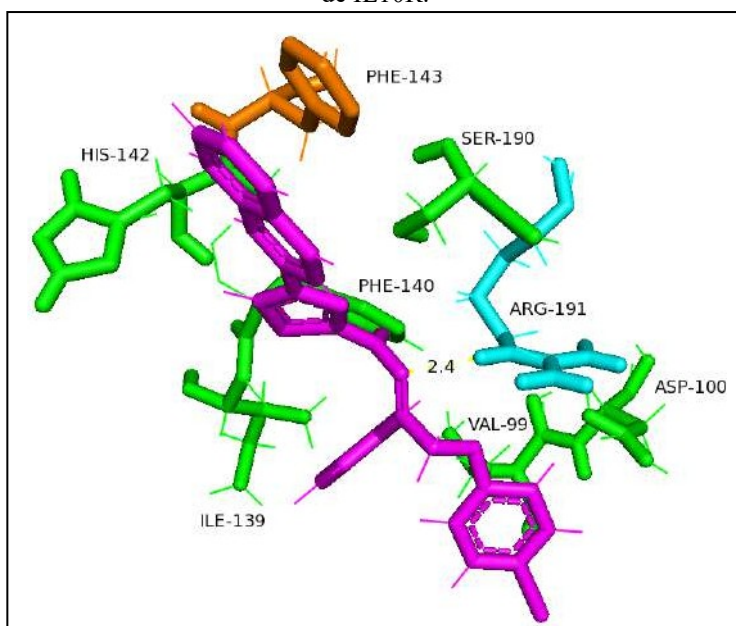
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que os resíduos VAL99, ILE139, PHE140, HIS142, PHE143 e ARG191 fizeram contatos hidrofóbicos, *cation-pi*, *pi-stacking*, *t-stacking* ou ligação de hidrogênio com a maioria das soluções.

Principalmente o número de contatos hidrofóbicos foi o responsável por diferenciar o melhor ranqueado (JM-13-Z) do pior ranqueado (JM-14-ZZ), além disso, JM-13-Z fez *pi-stacking* com o resíduo PHE143 e ligação de hidrogênio com o resíduo ARG191. Na figura 24 é possível observarmos o posicionamento de JM-13-Z no sítio de ligação de IL10R e suas principais interações.

Figura 24 – Interações intermoleculares entre JM-13-Z e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL10R.



Legenda: As interações entre o isômero E do composto JM-13 (magenta) e os resíduos de IL10R em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde, o resíduo que faz *pi-stacking* está em laranja e o resíduo que faz ligação de hidrogênio (com a distância em angstrom entre os átomos envolvidos na ligação) está em ciano.

4.1.4.3.9 Receptor A da interleucina 17 (IL17Ra)

Ao observar os resultados de *docking* para o IL17Ra (tabela 19), foi possível verificar que houve uma diferença de 2,4 kcal/mol entre JM-13-E (-8,6 kcal/mol) e LIZ-321-ZE (-6,2 kcal/mol). O isômero de maior estabilidade foi o ZZ.

Tabela 19 – Valores de energia de ligação (kcal/mol) para as soluções de *docking* dos compostos JM e LIZ em seus isômeros para IL17Ra.

Composto	EE	EZ	ZE	ZZ
JM-11	-6,4	-7,2	-7,3	-7,6
JM-13*	-8,6			-7,2
JM-14	-6,5	-6,3	-6,5	-6,9
JM-15	-6,7	-6,8	-7,8	-6,7
LIZ-311	-7,4	-7,1	-6,9	-7,5
LIZ-321	-6,8	-7,2	-6,2	-7,3
LIZ-331	-6,3	-6,9	-6,8	-7,1
LIZ-411	-7,1	-7,5	-7	-7,4
LIZ-421	-7,4	-7,1	-7,6	-7,6
LIZ-431	-6,8	-6,7	-6,3	-7,4
LIZ-511	-7,5	-7,5	-7	-7,2
LIZ-521	-7,6	-7,6	-6,6	-7,3
LIZ-531	-6,7	-7,4	-6,8	-7,2

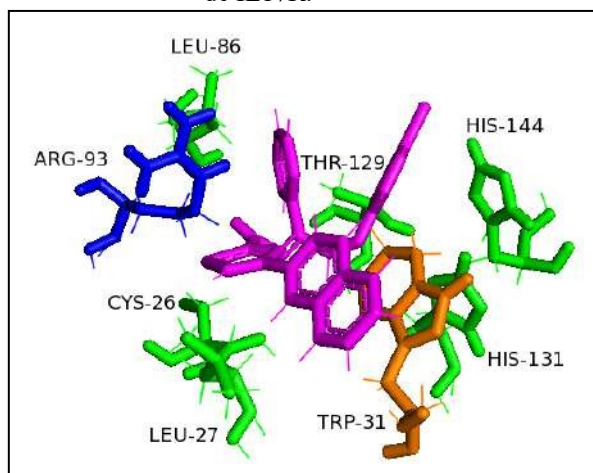
Fonte: Elaborada pela autora (2022).

Legenda: *O composto JM-13 possui apenas os isômeros E e Z, pois sua estrutura tem apenas uma dupla ligação.

Analisando as interações intermoleculares, foi possível verificar que os resíduos LEU27, LEU86 e THR129 fizeram contatos hidrofóbicos com a maioria das soluções. O resíduo TRP31 fez contatos hidrofóbicos, pi- ou t-*stacking* com a maioria das soluções. O resíduo ARG93 fez contatos hidrofóbicos, cátion-pi e ligações de hidrogênio com a maioria das soluções.

As interações do melhor ranqueado (JM-13-E) que se diferenciam do pior ranqueado (LIZ-321-ZE) foram principalmente contatos hidrofóbicos, além de JM-13-E fazer uma interação cátion-pi com o resíduo ARG93. Ambos os isômeros fizeram pi-*stacking* com o resíduo TRP31. Na figura 25 é possível verificarmos o posicionamento de JM-13-E na o sítio de ligação ao IL17Ra.

Figura 25 – Interações intermoleculares entre JM-13-E e os resíduos de aminoácidos do sítio de ligação de IL17R.



Legenda: As interações entre o isômero E do composto JM-13 (magenta) e os resíduos de IL17R em que os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde, o resíduo que faz *pi-stacking* está em laranja e o resíduo que faz cátion-pi está em azul.

4.2 ESTUDOS *IN VITRO*

4.2.1 Atividade citotóxica

4.2.1.1 Esplenócitos

As células esplênicas de camundongos foram utilizadas para verificar a atividade citotóxica dos compostos em células do sistema imune. A citotoxicidade variou de 54,5 μM (LIZ-431) a >213,5 μM (JM-11). A maioria dos compostos é menos tóxica que a droga de referência, exceto LIZ-431 (54,5 μM) e LIZ-311 (67,5 μM) (tabela 20).

Tabela 20 – Atividade citotóxica (CC_{50} em $\mu\text{g/mL}$ e μM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a esplenócitos murinos.

Compostos	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} (μM)
JM-11	>100	>213,5
JM-13	>100	>194,4
JM-14	>100	>209
JM-15	>100	>185
LIZ-311	38,5	67,5
LIZ-321	49,5	84,1
LIZ-331	>100	>166,5
LIZ-411	>100	>168,6
LIZ-421	49,6	81,2
LIZ-431	33,9	54,4
LIZ-511	50,7	83,2
LIZ-521	>100	>159,4
LIZ-531	59,5	93,1
Benzonidazol	17,7	68

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

No entanto, LIZ-311 apresentou atividade citotóxica extremamente semelhante ao benzonidazol, o qual possui CC_{50} de 68 μM . O composto menos tóxico (JM-11) foi cerca de 3,1 vezes menos tóxico que a droga de referência.

Ao serem depositados na base de dados ProTox-II, os compostos JM-11, JM-14, JM-15, LIZ-411 e LIZ-511 foram tidos como provavelmente atóxicos para células imunes, o que se comprova experimentalmente com todos tendo $CC_{50} > 80 \mu\text{M}$.

4.2.1.2 L929

A célula de linhagem L929 foi utilizada para verificar a atividade citotóxica em fibroblastos. Os compostos apresentaram citotoxicidades variadas frente a este tipo de célula, sendo LIZ-331 o composto mais tóxico (25,6 μM) e JM-11 o composto menos tóxico (tabela 21). Apenas quatro compostos tiveram atividade citotóxica menor que o benzonidazol, foram eles: JM-11 (>213,5 μM), JM-13 (194,4 μM), JM-14 (209 μM) e JM-15 (185 μM).

Tabela 21 – Atividade citotóxica (CC_{50} em $\mu\text{g/mL}$ e μM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a fibroblastos (L929).

Compostos	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} (μM)
JM-11	>100	>213,5
JM-13	>100	>194,4
JM-14	>100	>209
JM-15	>100	>185
LIZ-311	30,6	56,6
LIZ-321	43,8	74,4
LIZ-331	15,4	25,6
LIZ-411	34,6	58,4
LIZ-421	49,5	81
LIZ-431	48,6	78
LIZ-511	61,4	100,7
LIZ-521	22,7	36,2
LIZ-531	58,1	90,9
Benzonidazol	46,4	178,3

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.2.1.3 HepG2

A célula de linhagem HepG2 foi utilizada para verificar a atividade citotóxica em células hepáticas. A citotoxicidade para esse tipo celular variou entre 42,6 μM (LIZ-511) e 235,1 μM (LIZ-331).

É possível observar que todos os compostos possuem algum grau de toxicidade, destacando-se o composto LIZ-331 como menos tóxico, pois possui CC_{50} de 235,1 μM (tabela 22). Nenhum composto foi menos tóxico que o benzonidazol.

Tabela 22 – Atividade citotóxica (CC_{50} em $\mu\text{g/mL}$ e μM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a células hepáticas (HepG2).

Compostos	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} (μM)
JM-11	35,9	76,6
JM-13	70,18	136,4
JM-14	27,11	56,7
JM-15	101	186,9
LIZ-311	65	113,9
LIZ-321	33,98	57,7
LIZ-331	141,2	235,1
LIZ-411	26,55	44,8
LIZ-421	37,99	62,2
LIZ-431	31,12	50
LIZ-511	25,94	42,6
LIZ-521	38,31	61,1
LIZ-531	48,93	76,5
Benzonidazol	91,32	350,9

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.2.1.4 Raw 264.7

As células macrofágicas da linhagem Raw 264.7 foram utilizadas para verificar se os compostos são tóxicos para os macrófagos que são um subtipo das células imunes. A citotoxicidade dos compostos frente a este tipo celular variou de 43 (LIZ-411) a >418,1 μ M (JM-14) (tabela 23).

Tabela 23 – Atividade citotóxica (CC_{50} em μ g/mL e μ M) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a macrófagos (Raw 264.7).

Compostos	CC_{50} (μ g/mL)	CC_{50} (μ M)
JM-11	110,9	236,8
JM-13	>200	>388,8
JM-14	>200	>418,1
JM-15	88,5	163,8
LIZ-311	96,6	169,3
LIZ-321	70,2	119,3
LIZ-331	74,6	124,2
LIZ-411	25,5	43
LIZ-421	57,2	96,6
LIZ-431	39,9	64,2
LIZ-511	32,4	53,2
LIZ-521	49,3	78,6
LIZ-531	100,3	156,9
Benzonidazol	32,2	123,8

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

A maioria dos compostos testados foi menos tóxica que a droga de referência, a qual teve CC_{50} de 123,8 μ M. O composto menos tóxico, JM-14, foi aproximadamente três vezes menos tóxico que o benzonidazol.

4.2.2 Atividade tripanocida

Os compostos foram testados frente a epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas para verificar a atividade tripanocida.

4.2.2.1 Epimastigota

Com relação à atividade anti-epimastigotas, a maioria dos compostos não demonstrou atividade frente a esta forma evolutiva de *T. cruzi* (tabela 24).

Tabela 24 – Atividade tripanocida (IC₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (DM28).

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µM)
JM-11	17,2	36,7
JM-13	>100	>194,4
JM-14	9,3	19,4
JM-15	>100	>185
LIZ-311	>100	>175,3
LIZ-321	38,7	65,8
LIZ-331	>100	>166,5
LIZ-411	>100	>168,7
LIZ-421	>100	>163,7
LIZ-431	>100	>160,5
LIZ-511	>100	>164,1
LIZ-521	>100	>159,4
LIZ-531	1,8	2,8
Benzonidazol	0,8	3,1

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

O único composto que demonstrou atividade anti-epimastigota menor do que a droga de referência foi LIZ-531 (2,8 µM).

4.2.2.2 Tripomastigota

Além da atividade anti-epimastigota, também foi verificada a atividade anti-tripomastigota, que é a forma sanguínea circulante. Novamente, a maior parte dos compostos não demonstrou possuir atividade melhor que a droga de referência frente a esta forma evolutiva, com exceção de LIZ-311 (IC₅₀ de 8,6 µM) que foi menor que a do benzonidazol, o qual teve IC₅₀ de 14,6 µM (tabela 25).

Tabela 25 – Atividade tripanocida (IC₅₀ em µg/mL e µM) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y).

Compostos	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µM)
JM-11	12,7	27,1
JM-13	35,6	69,2
JM-14	47,4	99,1
JM-15	23,8	44
LIZ-311	4,9	8,6
LIZ-321	49,5	84,1
LIZ-331	>100	>166,5
LIZ-411	49,9	84,2
LIZ-421	20,9	34,2
LIZ-431	19	30,5
LIZ-511	33,8	55,5
LIZ-521	37,5	59,8
LIZ-531	56,1	87,7
Benzonidazol	3,8	14,6

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.2.2.3 Amastigota

Os compostos foram testados frente as formas intracelulares obrigatórias de *T. cruzi*, amastigotas, para finalizar a análise da atividade tripanocida.

Com exceção de LIZ-331 (2 μ M), a maioria dos compostos não demonstrou possuir atividade frente a esta forma evolutiva (tabela 26). Este composto foi quase três vezes mais ativo pra essa forma evolutiva do que o benzonidazol (5,7 μ M).

Tabela 26 – Atividade tripanocida (IC₅₀ em μ g/mL e μ M) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis frente a amastigota de *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen).

Compostos	IC ₅₀ (μ g/mL)	IC ₅₀ (μ M)
JM-11	>20	>42,7
JM-13	>20	>38,9
JM-14	>20	>41,8
JM-15	>20	>37
LIZ-311	>20	>35,1
LIZ-321	>20	>34
LIZ-331	1,2	2
LIZ-411	>20	>33,7
LIZ-421	>20	>32,7
LIZ-431	>20	>32,1
LIZ-511	>20	>32,8
LIZ-521	>20	>31,9
LIZ-531	>20	>31,3
Benzonidazol	1,5	5,7

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

4.2.3 Índice de seletividade (ISe)

O índice de seletividade (ISe) foi feito para todas as formas evolutivas de *T. cruzi*, verificando-se o quanto os compostos foram ativos para os parasitos sem causar danos às células normais. O ISe consiste na razão entre a CC₅₀ e a IC₅₀. Quanto maior o ISe, mais específica para o parasito é a atividade do composto. Para obtenção dos ISe foram considerados os valores de citotoxicidade e atividade tripanocida em micromolar. Os valores precedidos pelo símbolo “menor que” (<) são considerados valores relativos, enquanto os não precedidos por esse símbolo são considerados como valores absolutos. Quando a CC₅₀ é menor do que a IC₅₀, significa que o composto não possui seletividade para aquela forma evolutiva (NS).

Com relação à forma epimastigota de *T. cruzi*, a maioria dos compostos não demonstrou seletividade. Já o composto LIZ-531 foi mais seletivo para essa forma em

comparação aos quatro tipos celulares testados, com índices de seletividade chegando a ser 50 vezes mais seletivo para o parasito que para células fibroblásticas (tabela 27).

Tabela 27 – Índices de seletividade (ISE) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis relativos à forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Compostos	Esplenócito	L929	HepG2	Raw 264.7
JM-11	<5,8	<5,8	4,5	6,5
JM-13	<1	<1	NS	<2
JM-14	<10,8	<10,8	2,9	<21,6
JM-15	<1	<1	1	NS
LIZ-311	NS	NS	NS	NS
LIZ-321	1,3	1,1	NS	1,8
LIZ-331	<1	NS	<1,4	NS
LIZ-411	<1	NS	NS	NS
LIZ-421	NS	NS	NS	NS
LIZ-431	NS	NS	NS	NS
LIZ-511	NS	NS	NS	NS
LIZ-521	<1	NS	NS	NS
LIZ-531	33,3	32,5	27,3	50
Benzonidazol	21,9	57,5	113,2	39,9

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: NS = Não Seletivo.

Para a forma tripomastigota, as seletividades foram variadas; no entanto, o composto que se mostrou mais seletivo foi LIZ-311, chegando a ser 19 vezes mais seletivo para esta forma do que para os macrófagos (tabela 28).

Tabela 28 – Índices de seletividade (ISE) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis relativos à forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Compostos	Esplenócito	L929	HepG2	Raw 264.7
JM-11	<7,9	<7,9	2,8	8,7
JM-13	<2,8	<2,8	2	<5,6
JM-14	<2,1	<2,1	NS	<4,2
JM-15	<4,2	<4,2	4,3	3,7
LIZ-311	7,8	6,6	13,3	19,7
LIZ-321	1	NS	NS	1,4
LIZ-331	<1	NS	>1,4	NS
LIZ-411	>	NS	NS	NS
LIZ-421	<2			
LIZ-421	2,4	2,4	1,8	2,8
LIZ-431	1,8	2,6	1,6	2,1
LIZ-511	1,5	1,8	NS	NS
LIZ-521	<2,7	NS	1	1,3
LIZ-531	1,1	1	NS	1,8
Benzonidazol	4,7	12,2	24	8,5

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: NS = Não Seletivo.

Para a forma amastigota, LIZ-331 foi o único composto seletivo, sendo 117 vezes mais seletivo para o parasito que para as células hepáticas (tabela 29).

Tabela 29 – Índices de seletividade (ISe) de novos compostos fenoxi-hidrazino-tiazóis relativos à forma amastigota de *Trypanosoma cruzi*.

Compostos	Esplenócito	L929	Hepg2	Raw 264.7
JM-11	<5	>5	<1,8	5,5
JM-13	<5	>5	<3,5	<10
JM-14	<5	>5	<1,4	<10
JM-15	<5	>5	<5,1	4,4
LIZ-311	<1,9	1,6	<3,2	4,8
LIZ-321	<2,5	>2,2	<1,7	<3,5
LIZ-331	<83,3	12,8	117,6	62,1
LIZ-411	<5	>1,7	<1,3	<1,3
LIZ-421	<2,5	>2,5	<1,9	<3
LIZ-431	<1,7	>2,4	<1,6	<2
LIZ-511	<2,5	>3,1	<1,3	<1,6
LIZ-521	<5	>1,1	<1,9	<2,5
LIZ-531	<3	>2,9	<2,4	<5
Benzonidazol	11,9	31,3	61,6	21,7

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: NS = Não Seletivo.

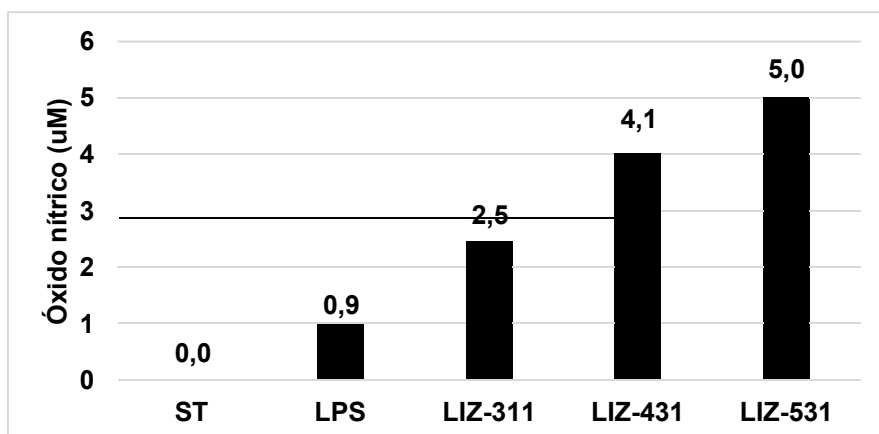
4.2.4 Atividade imunomoduladora

4.2.4.1 Dosagem de óxido nítrico (ON)

Para avaliar a produção de ON por macrófagos não-infectados, essas células foram estimuladas com diferentes concentrações dos compostos. A maioria dos compostos não induziu a produção de ON (dados não mostrados), com exceção de JM-14, LIZ-311, LIZ-431 e LIZ-531.

Os compostos LIZ-311, LIZ-431 e LIZ-531 induziram a produção de ON apenas na maior concentração de composto testada (200 µg/mL). Observando o gráfico 8, é possível verificar que a indução efetuada por LIZ-531 (5 µM) foi duas vezes maior que a promovida por LIZ-311 (2,5 µM), enquanto LIZ-431 produziu 4,1 µM de ON.

Gráfico 8 – Produção de óxido nítrico após estímulo de macrófagos com 200 µg/mL dos compostos LIZ-311, LIZ-431 e LIZ-531.

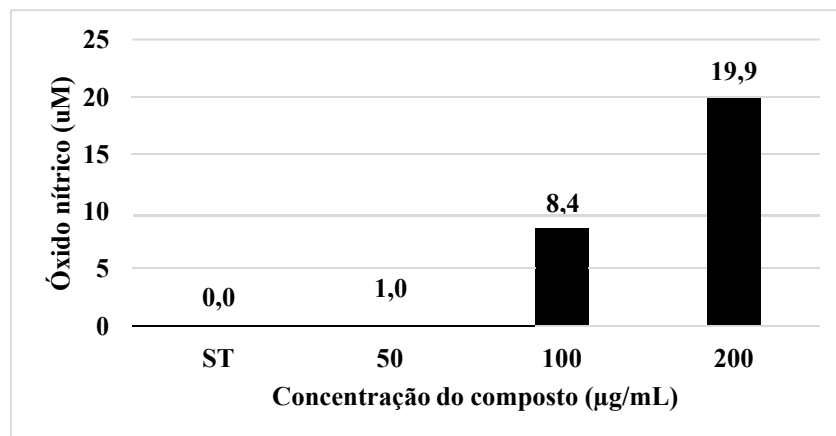


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: LPS = lipopolissacarídeo, ST = Sem tratamento.

Com relação a indução de ON por JM-14, foi possível verificar uma dose-dependência apenas nas três maiores concentrações testadas (50, 100 e 200 µg/mL (gráfico 9). Devido a isso, essas são as concentrações exibidas.

Gráfico 9 – Produção de óxido nítrico após estímulo de macrófagos com o composto JM-14.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: ST = Sem tratamento (apenas células e meio de cultura).

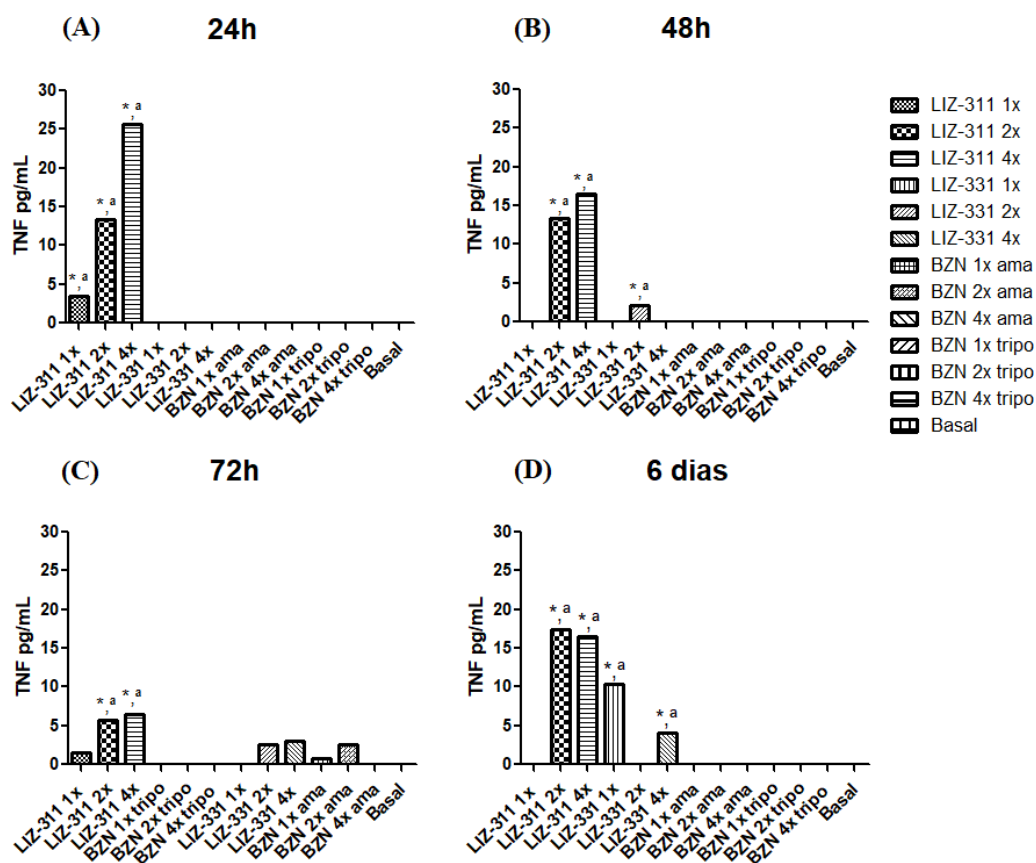
Na maior concentração, houve uma forte produção de ON, aproximadamente 20 µM, cerca de 22 vezes mais que o LPS (0,9 µM) e esse composto foi o maior indutor testado.

4.2.4.2 Dosagem de citocinas

Como apenas LIZ-311 e LIZ-331 terem atividade frente às formas evolutivas presentes no hospedeiro mamífero (tripomastigotas e amastigotas, respectivamente), o ensaio de dosagem de citocina foi conduzido apenas com essas moléculas. Após serem feitos os estímulos nas culturas dos esplenócitos com a IC₅₀ para tripomastigotas (LIZ-311) e para amastigotas (LIZ-331), foi feita a dosagem das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17 nos sobrenadantes coletados em 24h, 48h, 72h e 6 dias.

A comparação da produção de citocinas pelo composto LIZ-311 foi realizada considerando-se as IC₅₀ (1x, 2x e 4x) do benzonidazol frente a tripomastigotas. Para as análises comparativas entre LIZ-331 e a droga de referência, foram utilizadas as IC₅₀ (1x, 2x e 4x) do benzonidazol frente a amastigotas. Os valores de citocinas induzidos pelo mitógeno ConA para cada tempo de cada citocina estão descritos nas legendas dos gráficos.

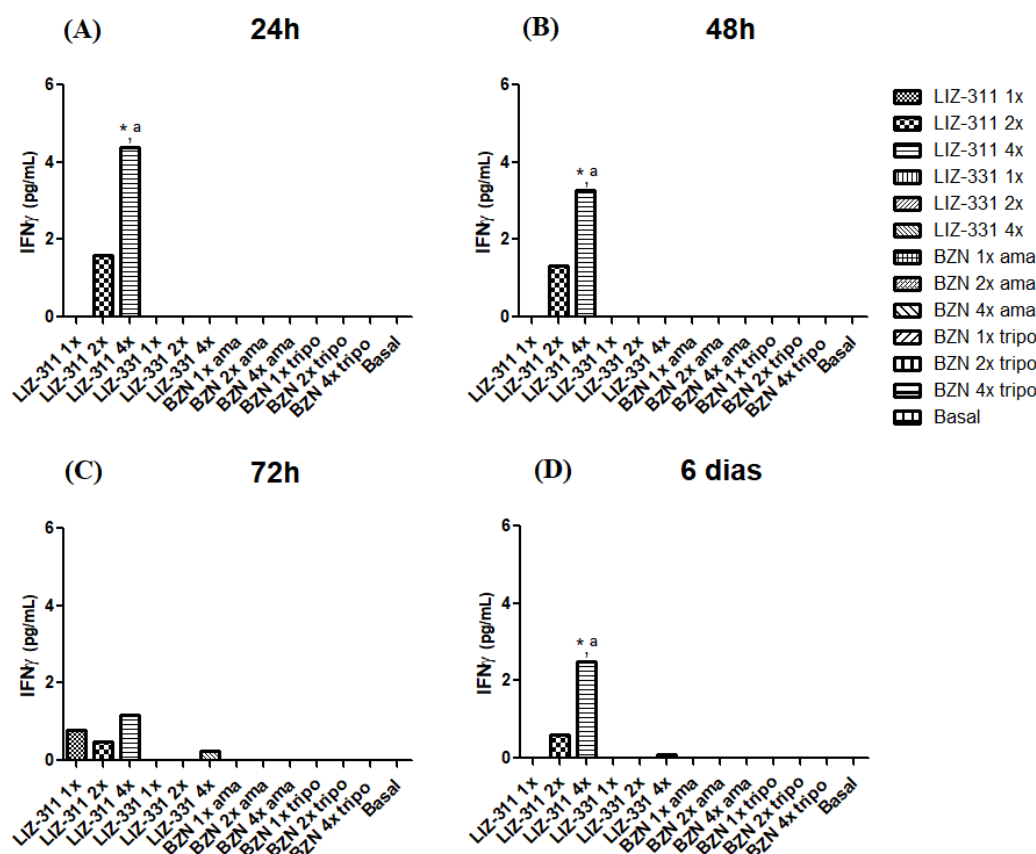
Analisando a produção de TNF- α , foi possível observar que LIZ-311 e LIZ-331 induziram a produção dessa citocina (gráfico 10). No tempo de 24h, as 3 concentrações de LIZ-311 testadas induziram de maneira significativa a produção dessa citocina. A partir de 48h, apenas 2x e 4x a IC₅₀ foram efetivas na indução. Acerca de LIZ-331, no tempo de 48h, as concentrações de 2x a IC₅₀ desse composto induziram a produção de TNF- α . Por outro lado, no tempo de 6 dias foram as concentrações de 1x e 4x IC₅₀ desse composto que foram efetivas. Ou seja, não houve homogeneidade na produção entre os tempos.

Gráfico 10 – Indução da produção da citocina TNF- α pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) 24h de incubação, (B) 48h de incubação, (C) 72h de incubação, (D) 6 dias de incubação; BZN = benzonidazol; * = $p < 0,05$ em relação ao basal; ^a = $p < 0,05$ em relação aos tratamentos com 1x, 2x, e 4x IC₅₀ do BZN; basal = controle sem tratamento (apenas esplenócitos e meio de cultura); tripo = IC₅₀ relativa à forma evolutiva tripomastigota; ama = IC₅₀ relativa à forma evolutiva amastigota. Valores do ConA em cada tempo: 24h (51,06 pg/mL), 48h (131,27 pg/mL), 72h (495,32 pg/mL), 6 dias (469,97 pg/mL).

No que refere à produção da citocina IFN- γ , nos tempos de 24h, 48h e 6 dias, apenas LIZ-311 (4x IC₅₀) induziu de maneira significativa a produção dessa citocina, tanto com relação ao basal, quanto aos tratamentos com o benzonidazol (gráfico 11).

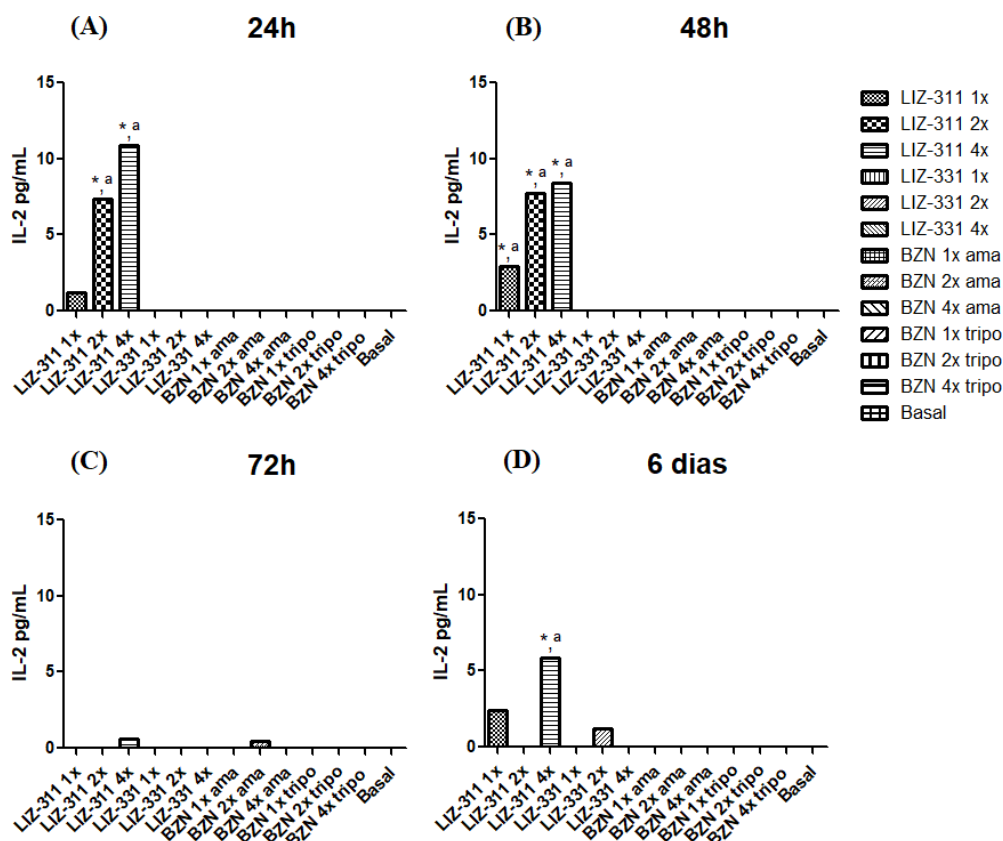
Gráfico 11 – Indução da produção da citocina IFN- γ pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) 24h de incubação, (B) 48h de incubação, (C) 72h de incubação, (D) 6 dias de incubação; BZN = benzonidazol; * = $p < 0,05$ em relação ao basal; ^a = $p < 0,05$ em relação aos tratamentos com 1x, 2x, e 4x IC₅₀ do BZN; basal = controle sem tratamento (apenas esplenócitos e meio de cultura); tripo = IC₅₀ relativa à forma evolutiva tripomastigota; ama = IC₅₀ relativa à forma evolutiva amastigota. Valores do ConA em cada tempo: 24h (29,45 pg/mL), 48h (244,18 pg/mL), 72h (743,97 pg/mL), 6 dias (636,52 pg/mL).

Apenas o composto LIZ-311 induziu a produção da citocina IL-2 nos tempos de 24h, 48h e 6 dias (gráfico 12). No tempo de 24h, as concentrações de 2x e 4x a IC₅₀ foram efetivas, enquanto no tempo de 48h todas as concentrações foram capazes de induzir a produção dessa citocina. Após 6 dias de incubação, apenas a concentração de 4x a IC₅₀ de LIZ-311 causou estímulo da produção de IL-2.

Gráfico 12 – Indução da produção da citocina IL-2 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.

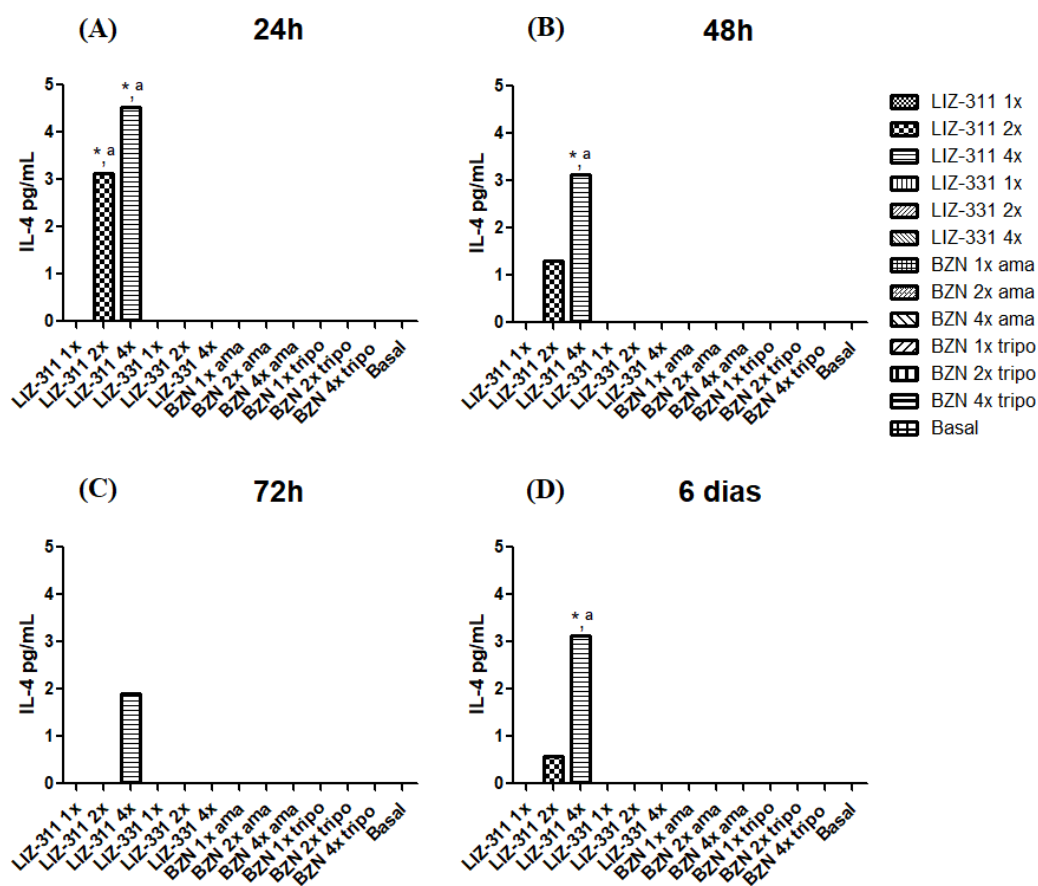


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) 24h de incubação, (B) 48h de incubação, (C) 72h de incubação, (D) 6 dias de incubação; BZN = benzonidazol; * = $p < 0,05$ em relação ao basal; ^a = $p < 0,05$ em relação aos tratamentos com 1x, 2x, e 4x IC_{50} do BZN; basal = controle sem tratamento (apenas esplenócitos e meio de cultura); tripo = IC_{50} relativa à forma evolutiva tripomastigota; ama = IC_{50} relativa à forma evolutiva amastigota. Valores do ConA em cada tempo: 24h (40,3 pg/mL), 48h (101,18 pg/mL), 72h (18,42 pg/mL), 6 dias (0 pg/mL).

Apenas o composto LIZ-311 induziu a produção de IL-4 (gráfico 13). Houve produção dessa citocina nos tempos de 24h, 48h e 6 dias. Após 24h de incubação, as concentrações de 2x e 4x a IC_{50} foram indutoras, enquanto após 48h e 6 dias, apenas a concentração de 4x a IC_{50} foi efetiva.

Gráfico 13 – Indução da produção da citocina IL-4 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.

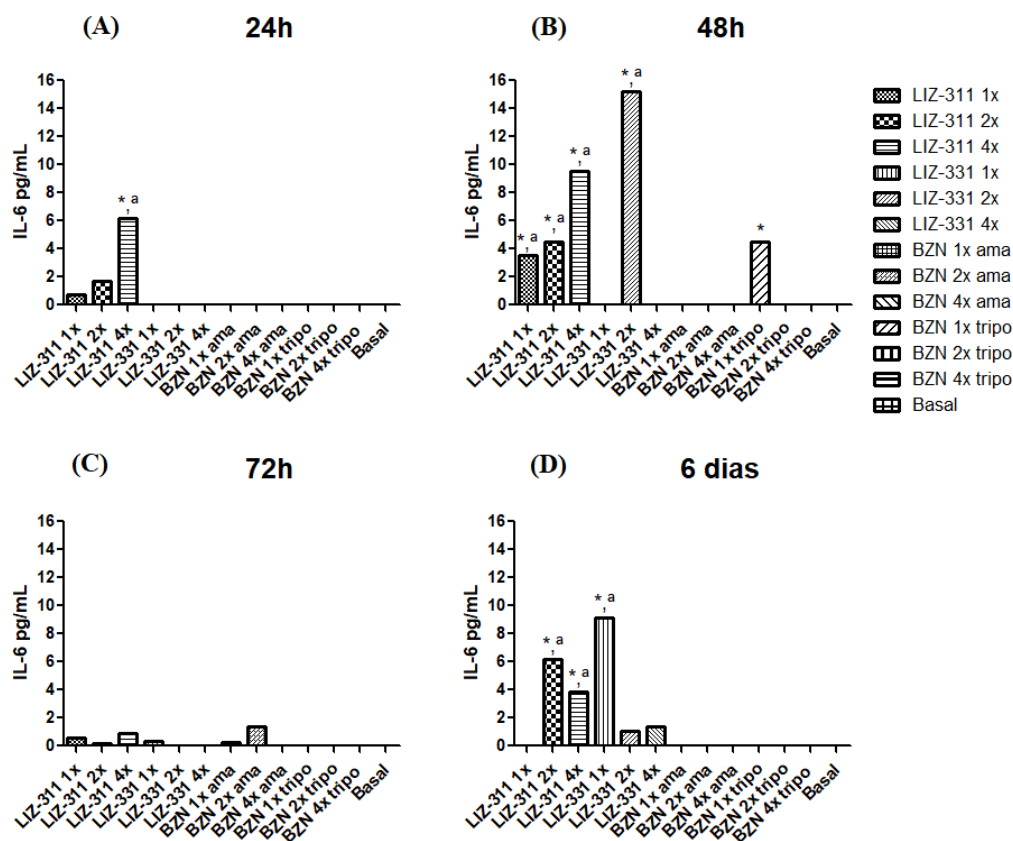


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) 24h de incubação, (B) 48h de incubação, (C) 72h de incubação, (D) 6 dias de incubação; BZN = benzonidazol; * = $p < 0,05$ em relação ao basal; ^a = $p < 0,05$ em relação aos tratamentos com 1x, 2x, e 4x IC_{50} do BZN; basal = controle sem tratamento (apenas esplenócitos e meio de cultura); trip = IC_{50} relativa à forma evolutiva tripomastigota; ama = IC_{50} relativa à forma evolutiva amastigota. Valores do ConA em cada tempo: 24h (1,6 pg/mL), 48h (22,33 pg/mL), 72h (64,38 pg/mL), 6 dias (0,11 pg/mL).

Houve produção da citocina IL-6 tanto por LIZ-311 quanto por LIZ-331 (gráfico 14). O composto LIZ-311 induziu nos tempos de 24h, 48h e 6 dias, enquanto LIZ-331 induziu nos tempos de 48h e 6 dias. Com relação à indução promovida por LIZ-331: após 24h de incubação, apenas 4x IC_{50} estimulou a produção, após 48h todas as concentrações foram efetivas e após 6 dias 2x e 4x a IC_{50} foram efetivas. Com relação à indução promovida por LIZ-311: decorridas 48h de incubação, a concentração de 2x IC_{50} foi efetiva, enquanto após 6 dias foi a concentração de 1x a IC_{50} .

Gráfico 14 – Indução da produção da citocina IL-6 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.

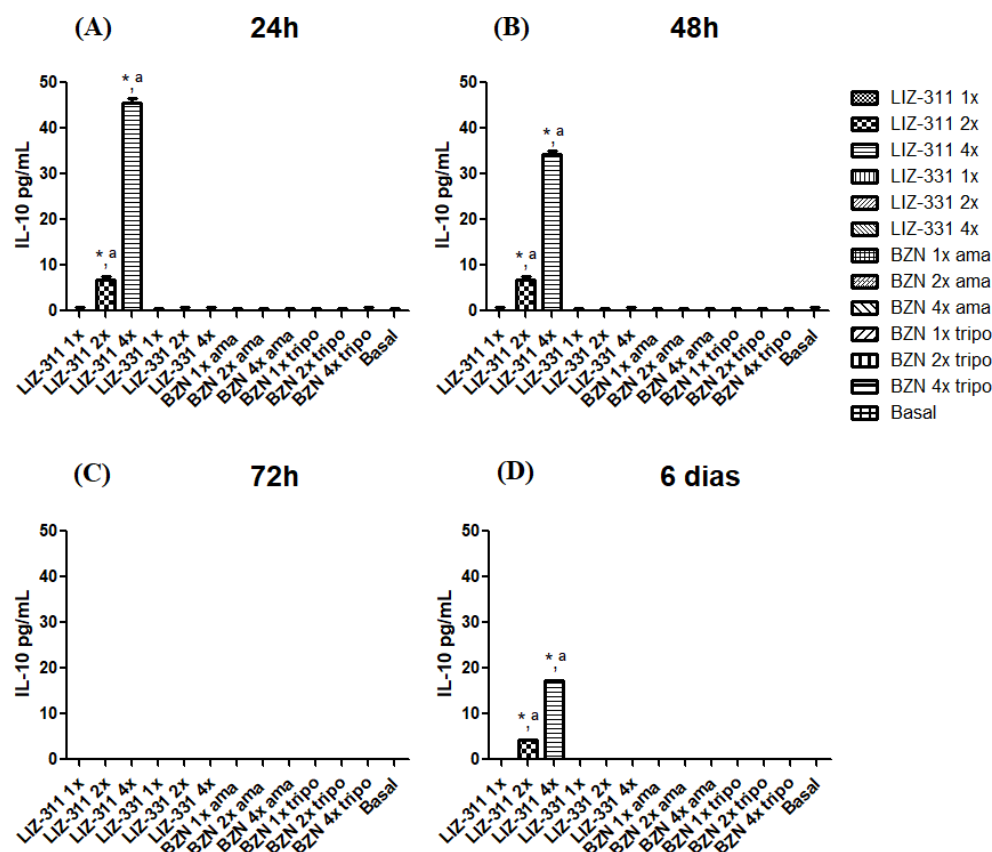


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) 24h de incubação, (B) 48h de incubação, (C) 72h de incubação, (D) 6 dias de incubação; BZN = benzonidazol; * = $p < 0,05$ em relação ao basal; ^a = $p < 0,05$ em relação aos tratamentos com 1x, 2x, e 4x IC_{50} do BZN; basal = controle sem tratamento (apenas esplenócitos e meio de cultura); tripo = IC_{50} relativa à forma evolutiva tripomastigota; ama = IC_{50} relativa à forma evolutiva amastigota. Valores do ConA em cada tempo: 24h (1,36 pg/mL), 48h (9,53 pg/mL), 72h (33,52 pg/mL), 6 dias (67,79 pg/mL).

No gráfico 15 é possível observar que o composto LIZ-311 foi o único indutor da citocina IL-10 nas concentrações de 2x e 4x a IC_{50} e nos tempos testados, exceto em 72h.

Gráfico 15 – Indução da produção da citocina IL-10 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.

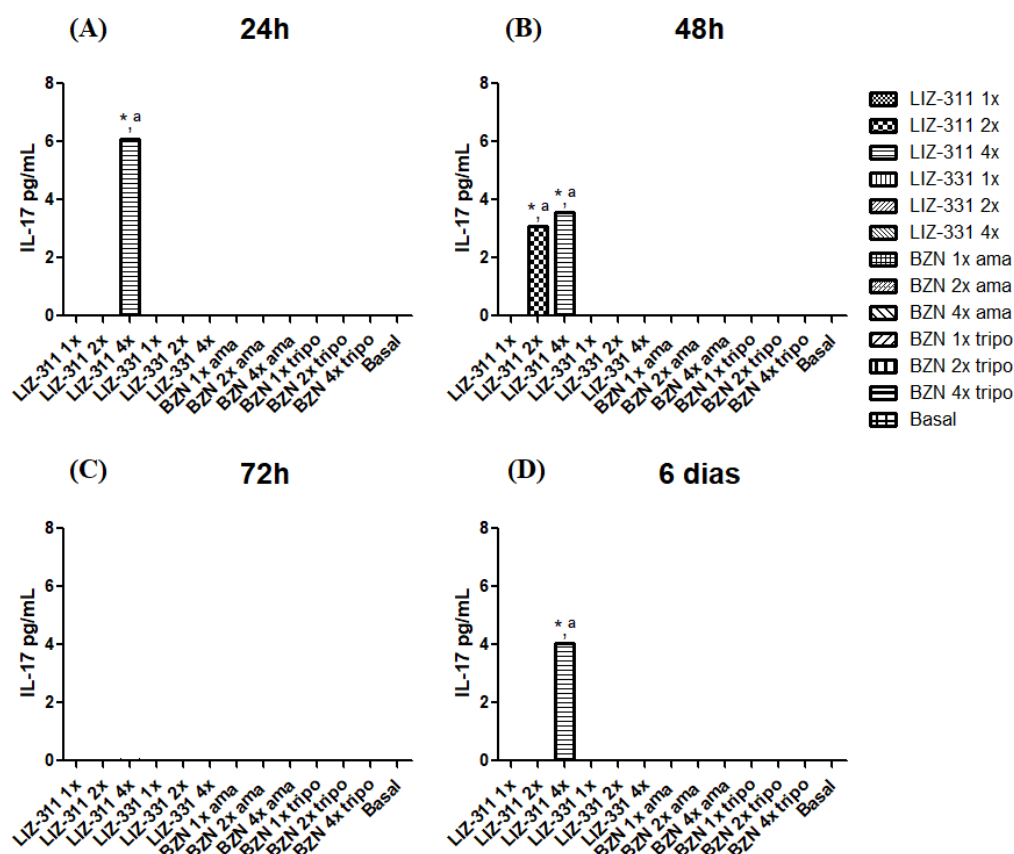


Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) 24h de incubação, (B) 48h de incubação, (C) 72h de incubação, (D) 6 dias de incubação; BZN = benzonidazol; * = $p < 0,05$ em relação ao basal; ^a = $p < 0,05$ em relação aos tratamentos com 1x, 2x, e 4x IC₅₀ do BZN; basal = controle sem tratamento (apenas esplenócitos e meio de cultura); tripo = IC₅₀ relativa à forma evolutiva tripomastigota; ama = IC₅₀ relativa à forma evolutiva amastigota. Valores do ConA em cada tempo: 24h (0 pg/mL), 48h (0 pg/mL), 72h (35,21 pg/mL), 6 dias (13,39 pg/mL).

O composto LIZ-311 foi o único indutor da citocina IL-17 (gráfico 16). Houve indução da produção dessa citocina nos tempos testados, exceto em 72h. Após 24h e após 6 dias de incubação, apenas 4x a IC₅₀ desse composto foi capaz de induzir produção. Acerca do tempo de 48h, tanto 2x quanto 4x a IC₅₀ foram concentrações efetivas.

Gráfico 16 – Indução da produção da citocina IL-17 pelos compostos LIZ-311 e LIZ-331.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) 24h de incubação, (B) 48h de incubação, (C) 72h de incubação, (D) 6 dias de incubação; BZN = benzonidazol; * = $p < 0,05$ em relação ao basal; ^a = $p < 0,05$ em relação aos tratamentos com 1x, 2x, e 4x IC_{50} do BZN; basal = controle sem tratamento (apenas esplenócitos e meio de cultura); trip = IC_{50} relativa à forma evolutiva tripomastigota; ama = IC_{50} relativa à forma evolutiva amastigota. Valores do ConA em cada tempo: 24h (0 pg/mL), 48h (0,15 pg/mL), 72h (29,00 pg/mL), 6 dias (563,67 pg/mL).

4.2.5 Análise de morte celular

4.2.5.1 Anexina V e 7-AAD

As formas tripomastigotas foram tratados com 1x e 2x a IC_{50} dos compostos e marcados com anexina-V (AV) e 7-AAD para avaliar qual tipo de morte celular os compostos induziam. Anexina-V é lido no canal FL1-H do citômetro de fluxo e 7-AAD, no canal FL3-H. Como o composto LIZ-311 foi o único que demonstrou IC_{50} menor que o benzonidazol, sendo o único a ser testado para análise de morte celular para tripomastigota.

Foram considerados parasitos em morte por apoptose inicial aqueles marcados pela anexina-V (AV) apenas. A AV se liga à fosfatidilserina da membrana das células, que quando estão em apoptose, expõem essa fosfatidilserina para o meio externo. Enquanto que células em necrose estão bastante danificadas e um dos fenômenos é a maior exposição nuclear ao meio externo, fazendo com que o marcador 7-AAD possa se ligar a essas células. Consequentemente, células marcadas pelo 7-AAD foram consideradas em necrose. Já células duplamente marcadas com AV e 7-AAD podem ser consideradas tanto em apoptose tardia como em necrose. Aqui, essa dupla marcação foi considerada como apoptose tardia.

Após o tratamento dos tripomastigotas com 1x a IC_{50} do composto LIZ-311, foi possível verificar a indução dos três tipos de morte celular em comparação ao controle não tratado (17^a), onde também pode ser visualizada as porcentagens de parasitos marcados.

No entanto, apenas a indução de apoptose inicial e tardia foi estatisticamente diferente do controle sem tratamento ($p < 0,05$). Ou seja, não houve indução de necrose nesse tratamento e houve maior porcentagem de parasitos marcados para apoptose inicial (5,99%).

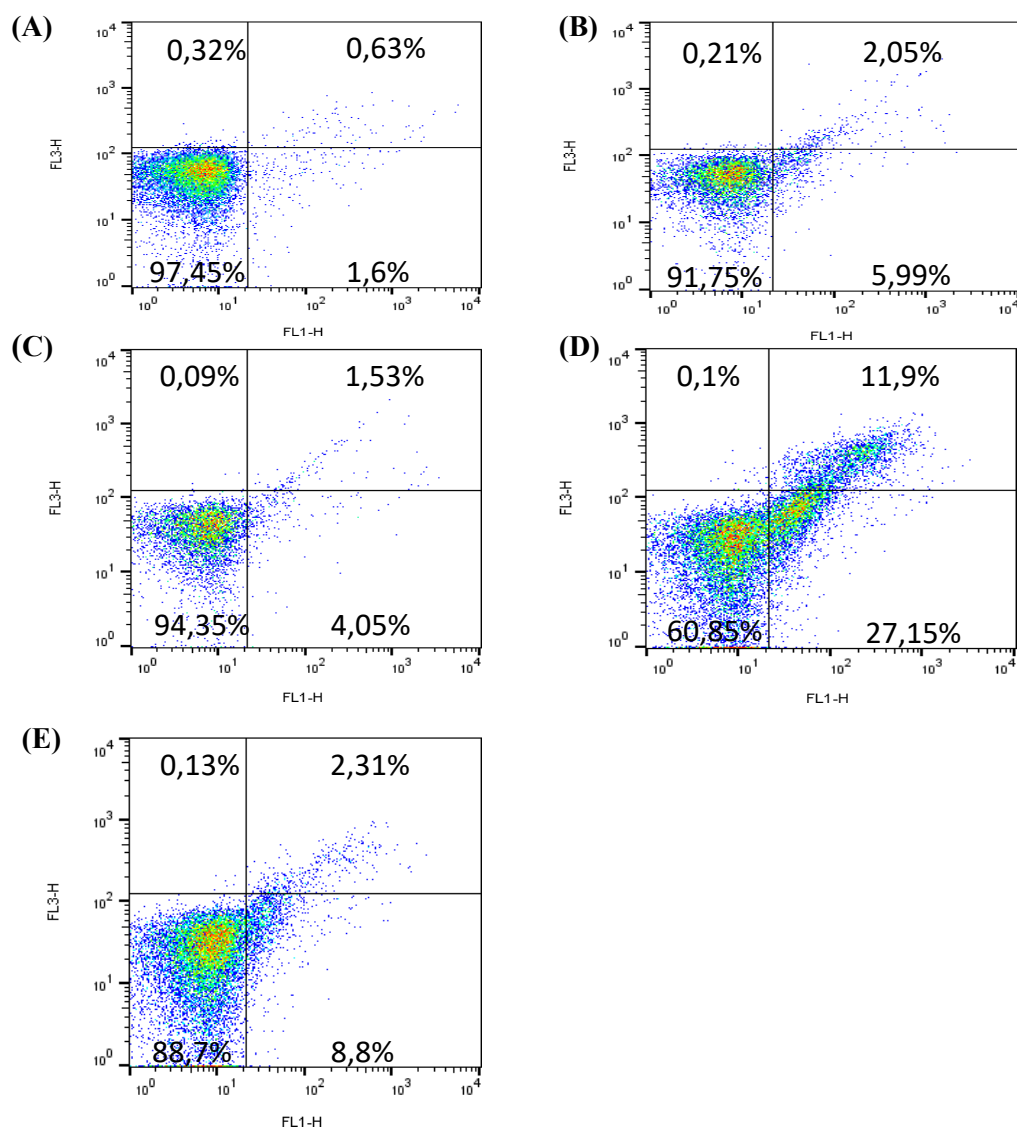
No tratamento com 2x a IC_{50} , houve indução de apoptose inicial e tardia com diferença estatística em relação ao controle sem tratamento ($p < 0,05$). Além disso, houve uma diminuição da porcentagem de parasitos marcados para necrose ($p < 0,05$). Da mesma maneira que o tratamento com 1x a IC_{50} , a maior porcentagem de parasitos marcados foi para apoptose inicial (4,05%).

Também foi feito o tratamento dos tripomastigotas com o 1x e 2x a IC_{50} do benzonidazol para esta forma evolutiva (gráfico 17). Em ambos os tratamentos, houve indução dos três tipos de morte celular com diferença estatisticamente significativa para o controle não tratado ($p < 0,05$). Quando tratado com 2x a IC_{50} , a porcentagem de parasitos marcados para apoptose, tanto tardia quanto inicial, teve um aumento de cinco vezes para apoptose tardia e de três vezes para apoptose inicial.

Não houve diferença estatística para a necrose entre o composto LIZ-311 e o benzonidazol, tanto no tratamento com 1x quanto com 2x a IC_{50} . Ou seja, ambos induziram esse tipo de morte celular de maneira equivalente. Já para apoptose inicial, houve diferença ($p < 0,05$) entre LIZ-311 e o benzonidazol em ambos os tratamentos, com o benzonidazol induzindo mais esse tipo de morte celular (gráficos 17D e E). Para apoptose tardia, houve diferença ($p < 0,05$) apenas no tratamento com 2x a IC_{50} , tendo o

benzonidazol induzido quase oito vezes mais esse tipo de morte. No tratamento com 1x a IC_{50} , a indução desse tipo de morte celular foi igual entre ambos (LIZ-311 e a droga de referência).

Gráfico 17 – *Dot plots* do perfil de morte celular (Anexina-V/Iodeto de propídio) avaliado por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

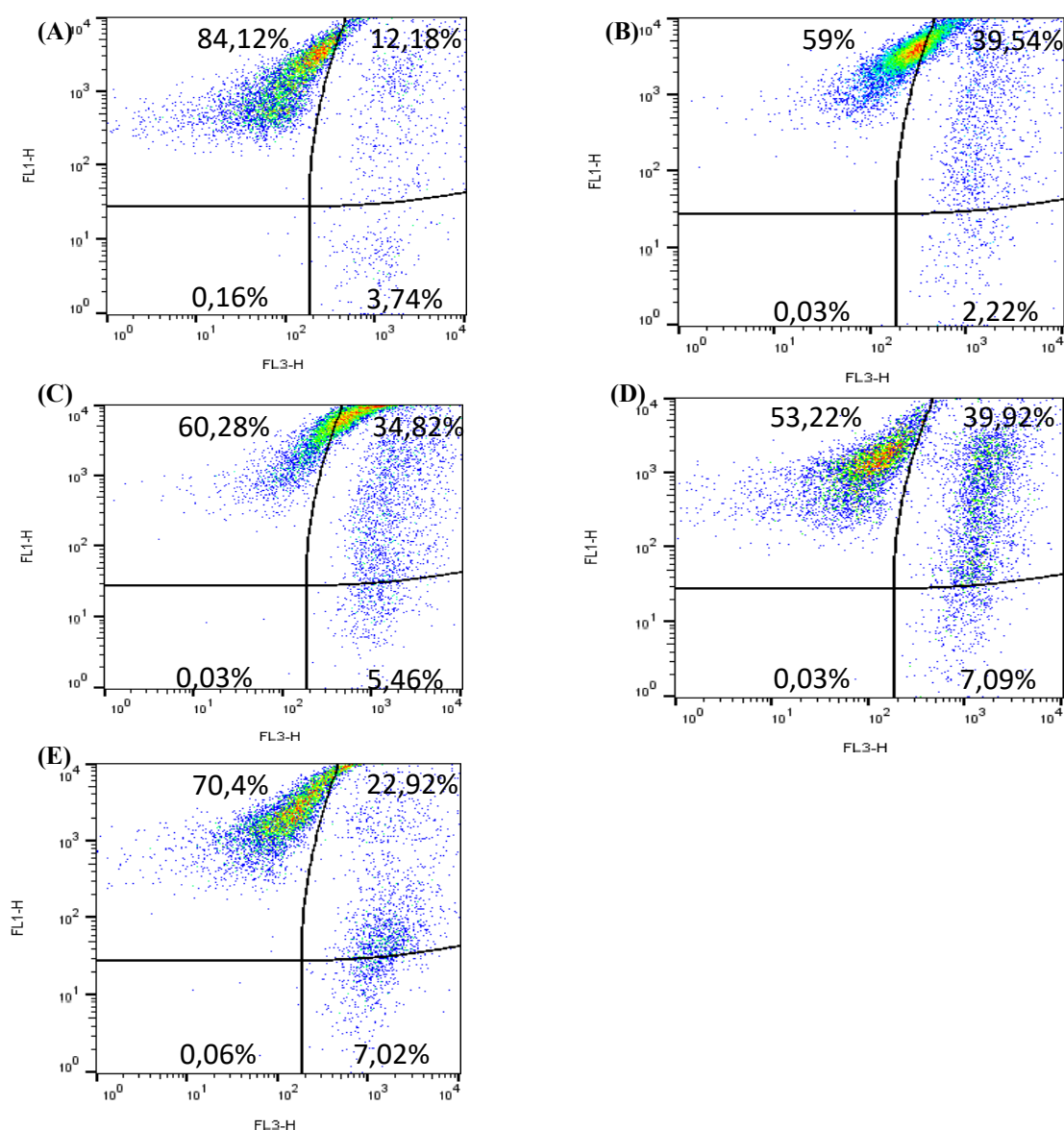
Legenda: (A) Controle sem tratamento, (B) tratamento com 1x a IC_{50} do composto LIZ-311, (C) tratamento com 2x a IC_{50} do composto LIZ-311, (D) tratamento com 1x a IC_{50} do Benzonidazol, (E) tratamento com 2x a IC_{50} do Benzonidazol. A AV é lida no canal FL1-H enquanto o 7AAD é lido em FL3-H.

4.2.5.2 Calceína/homodímero de etídio

Este ensaio teve como objetivo esclarecer se os parasitos duplamente negativos para AV/PI estavam, de fato, vivos. Ele é composto por dois marcadores: a calceína (Cal) e o homodímero de etídio (EthD). O primeiro é lido no canal FL1-H e o segundo no canal FL3-H. As células marcadas com o a calceína são consideradas vivas, pois indica que a função esterase celular está em atividade. As células marcadas com o EthD são consideradas mortas, pois esse é um marcador que só atravessa membranas celulares não-integras. As células duplamente marcadas estão em processo de morte celular.

No tratamento com LIZ-311, houve um aumento dose-dependente dos parasitos EthD⁺, onde a porcentagem de parasitos marcados foi 2,46 vezes maior no tratamento com 2x a IC₅₀ (gráfico 18).

Gráfico 18 – *Dot plots* do perfil de morte celular (Calceína/homodímero de etídio) avaliado por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: (A) Controle sem tratamento, (B) tratamento com 1x a IC_{50} do composto LIZ-311, (C) tratamento com 2x a IC_{50} do composto LIZ-311, (D) tratamento com 1x a IC_{50} do Benzonidazol, (E) tratamento com 2x a IC_{50} do Benzonidazol. A calceína é lida no canal FL1-H enquanto o homodímero de etídio é lido em FL3-H.

Como no ensaio de marcação com AV/PI, excluindo-se os parasitos vivos (Cal+), a população com maior porcentagem de marcação pra todos os tratamentos foi a duplamente marcada. No tratamento com o benzonidazol, houve uma redução dose-dependente dos parasitos duplamente positivos (em processo de morte celular) e praticamente não houve alteração nos parasitos marcados com o homodímero de etídio (EthD+) entre as duas concentrações testadas (gráfico 18).

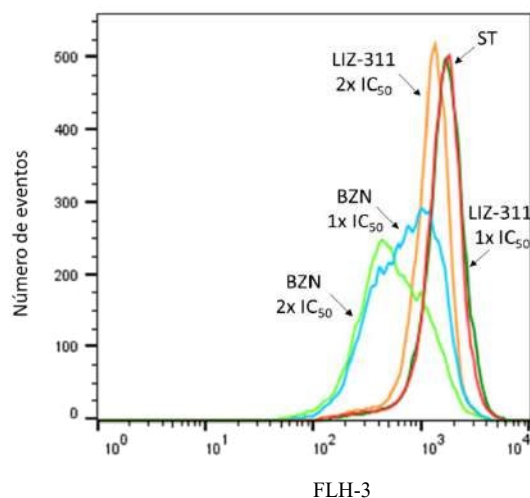
Em comparação ao ensaio com AV/PI, houve uma redução na porcentagem de parasitos vivos, tanto em relação aos tratamentos, quanto aos controles.

4.2.5.3 Laranja de acridina e rodamina

A marcação dos tripomastigotas com laranja de acridina e rodamina também foi feita para melhor compreender o mecanismo de morte celular induzido pelos compostos. O primeiro é um marcador de compartimentos ácidos, enquanto que o segundo é um marcador de potencial de membrana mitocondrial. Sendo assim, alterações da fluorescência desses dois marcadores indicam alterações em seus respectivos compartimentos.

No histograma de sobreposição para este marcador (gráfico 19) é possível ver a variação na fluorescência nos tratamentos com LIZ-311 (verde escuro e laranja) e benzonidazol (azul e verde claro) em relação ao controle sem tratamento (vermelho). Como o composto LIZ-311 foi o único que demonstrou IC_{50} menor que o benzonidazol, ele foi o único a ser testado para análise de morte celular para tripomastigota.

Gráfico 19 – Histograma de sobreposição (laranja de acridina) da avaliação por citometria de fluxo do tratamento com LIZ-311 e benzonidazol.



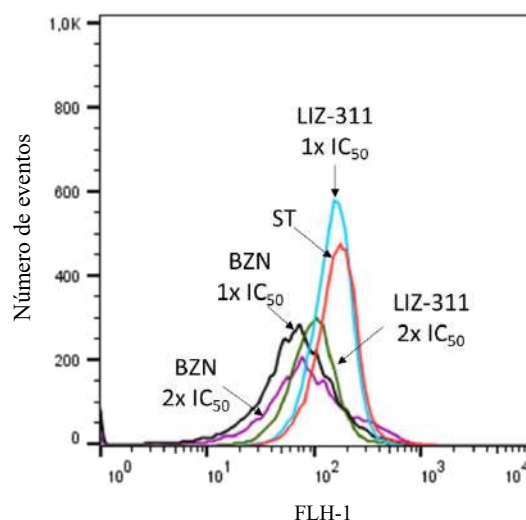
Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: O tratamento com 1x a IC_{50} do benzonidazol (BZN) está representado em azul, enquanto o tratamento com 2x a IC_{50} está representado em verde claro. A linha em vermelho é referente ao controle sem tratamento marcado com laranja de acridina (ST). Em verde escuro está o tratamento com 1x a IC_{50} do composto LIZ-311 e em laranja está o tratamento com 2x a IC_{50} desse composto. A rodamina é lida no canal FL1-H enquanto a laranja de acridina é lida em FL3-H.

Após o tratamento dos tripomastigotas com 1x e 2x a IC_{50} do composto LIZ-311 para essa forma evolutiva e da marcação dos parasitos com laranja de acridina, os índices de variação da fluorescência (IV) foram respectivamente +0,1 e -0,2. Ou seja, com o aumento da concentração, há uma diminuição dos compartimentos ácidos. Esse resultado está alinhado tanto com o controle positivo (saponina a 0,1%) em que o IV foi de -0,6, quanto com o tratamento com o benzonidazol, onde os IV para os tratamentos com 1x e 2x a IC_{50} foram -0,4 e -0,6.

Com relação à marcação com rodamina, no histograma de sobreposição para este marcador (gráfico 20) é possível ver a discreta variação da fluorescência nos tratamentos com LIZ-311 (azul claro e verde) e benzonidazol (preto e roxo) em relação ao controle sem tratamento (vermelho), além da semelhança de variação entre os tratamentos.

Gráfico 20 – Histograma de sobreposição (rodamina) da avaliação por citometria de fluxo do tratamento com LIZ-311 e benzonidazol.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: O tratamento com 1x a IC_{50} do benzonidazol (BZN) está representado em preto, enquanto o tratamento com 2x a IC_{50} está representado em roxo. A linha em vermelho é referente ao controle sem tratamento marcado com rodamina (ST). Em azul claro está o tratamento com 1x a IC_{50} do composto LIZ-311 e em verde está o tratamento com 2x a IC_{50} desse composto. A rodamina é lida no canal FL1-H enquanto a laranja de acridina é lida em FL3-H.

O IV do tratamento com 1x a IC_{50} de LIZ-311 foi de -0,2 e do tratamento com 2x a IC_{50} foi de -0,3, ou seja, houve uma discreta diminuição com o aumento da concentração. O contrário ocorreu no tratamento com o benzonidazol, onde o IV de 1x a IC_{50} foi de -0,4 e aumentou discretamente para 0,3 no tratamento com 2x a IC_{50} . No entanto, os IVs dos tratamentos com LIZ-311 e com o benzonidazol foram bastante semelhantes.

5 DISCUSSÃO

Os compostos testados no presente trabalho foram desenhados tendo como alvo uma cisteíno-protease de *T. cruzi*, a cruzaina, a qual é um alvo validado para os estudos de novos compostos para a doença de Chagas (ÁLVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012; CAZZULO, 2002). O principal modo de ação dos compostos que inibem as cisteíno-proteases é pela interrupção da produção das enzimas e do transporte delas para lisossomos, pois elas são enzimas lisossomais (APT, 2010).

Inicialmente, os compostos foram testados para essa enzima; no entanto, não houve grande diferença de *score* entre os compostos com maior e menor ranqueamentos, o que nos encorajou a realizar os estudos *in silico* dos compostos em outros importantes alvos de *T. cruzi* descritos na literatura, como esqualeno sintase, 14-alfa demetilase e tripanotiona redutase (LIÑARES, 2018; SCARIM et al., 2018;). Do ponto de vista *in silico*, os compostos demonstraram uma maior afinidade (*scores*) pelas enzimas esqualeno sintase e 14-alfa demetilase. Com relação à 14-alfa demetilase, os compostos interagiram com o grupo Heme dessa enzima, o que é descrito na literatura como um importante passo na estabilização dos compostos na estrutura das enzimas (LEPESHEVA et al., 2010).

Adicionalmente, foram utilizadas bases de dados bem descritas na literatura para se buscar alvos preditos, tanto de toxicidade quanto de atividade tripanocida. Ao buscar por possíveis alvos para *T. cruzi*, o único alvo desse parasito indicado para os compostos foi a cruzaina. Quando as moléculas foram examinadas na base de dados ProTox-II, um possível alvo foi apontado: a enzima MAOA humana.

As enzimas monoamina oxidase humanas (MAO) são envolvidas no metabolismo de diferentes xenobióticos, mais especificamente metabolizando aminas em aldeídos (FOTI; DALVIE, 2016). Há duas enzimas que fazem parte dessa família, MAOA e a MAOB, as quais se diferem pelos substratos preferenciais e inibidores (YOU DIM; EDMONDSON; TIPTON, 2006). Devido a isso, não é interessante que esses compostos inibam fortemente essas enzimas, pois isso pode levar a uma menor depuração dos mesmos. Quando os compostos foram submetidos à base de dados SEA, essas mesmas enzimas apareceram como possíveis alvos entre os melhores ranqueados. Isso nos encorajou a prosseguir com o *docking* dos compostos frente a essas enzimas, utilizando as abordagens *in silico* para avaliar a capacidade que os compostos têm de inibir essa

enzima.

Ao analisar os resultados de *docking* para essas enzimas foi possível observar que o composto JM-13 (isômero Z) foi o quinto ranqueado para MAOA e os seus dois isômeros foram os 2 primeiros ranqueados para MAOB, corroborando com os achados nas bases de dados. Apesar disso, esses compostos não foram tóxicos nas células testadas, sugerindo que pode haver outras características que influenciem na toxicidade dos mesmos.

Além de estarem envolvidas no metabolismo de xenobióticos, essas enzimas são implicadas no metabolismo de neurotransmissores como adrenalina, noradrenalina e dopamina, estando relacionadas com doenças do sistema nervoso central (YOUDEM, 2018). Com isso, sugerimos que os compostos da série JM sejam investigados futuramente com relação à atividade em doenças neurodegenerativas.

Adicionalmente, o *docking* molecular foi utilizado para avaliar a interação das moléculas com alvos do sistema imune. Esta abordagem vem sendo utilizada na literatura para investigar o potencial imunomodulador de moléculas testadas contra câncer, asma, anti-inflamatórias, entre outras (ALAM; KHAN, 2018; JOHNSON et al., 2020; NAKAMURA et al., 2017). As moléculas testadas no presente trabalho demonstraram maior afinidade geral pelos alvos da resposta imune inata (TLR2 e TLR4), enquanto para os alvos da resposta imune adaptativa (receptores de citocinas) as afinidades foram semelhantes entre si. Os compostos da série JM, em especial JM-13, demonstraram ter potencial imunomodulador *in silico*. É válido frisar que o composto JM-13 foi o melhor ranqueado para 7 dos 9 alvos do sistema imune testados e, para os 9 alvos testados, os compostos dessa série estavam sempre entre os 10 melhores ranqueados.

Destaca-se que, classicamente, TNF- α e IFN- γ estão envolvidos na produção de ON, principalmente por macrófagos (MUÑOZ-FERNANDEZ; FERNÁNDEZ; FRESNO, 1992). O composto LIZ-311 esteve entre os 10 melhores ranqueados para TNFR e IFNGR e os compostos LIZ-431 e JM-14 entre os 10 melhores ranqueados para IFNGR, além de terem induzido *in vitro* a produção de ON. O composto LIZ-531, que também induziu a produção *in vitro* de ON, teve uma diferença de apenas 0,8 kcal/mol para o melhor ranqueado tanto no *docking* com TNFR quanto IFNGR.

Parâmetros de farmacocinética e farmacodinâmica são extremamente importantes dentro da cadeia farmacêutica para a descoberta de novos fármacos (PELLEGATTI, 2012). A predição *in silico* de parâmetros de ADME e toxicidade tem se mostrado de grande importância e seu uso na pesquisa vem sendo cada vez mais encorajado

(ALQAHTANI, 2017). Utilizando a ferramenta *SwissADME*, foi possível verificar que no geral os compostos são pouco hidrossolúveis e mais lipossolúveis, o que pode diminuir a biodisponibilidade oral dos mesmos (NEWBY; FREITAS; GHAFOURIAN, 2015). Isso fica mais claro ao ser observado a possibilidade dos compostos em serem absorvidos pelo trato gastrointestinal em que a maioria foi classificada tendo baixa chances de absorção por essa via.

Estas características de biodisponibilidade preditas não representam, necessariamente, um impedimento tecnológico para continuar os estudos com estas moléculas. A tecnologia farmacêutica tem à disposição recursos sofisticados para sobrepujar problemas de baixa biodisponibilidade (LIU et al., 2016). Uma dessas tecnologias de sistemas de *drug delivery* é o uso de carreadores, como nanopartículas, nanovesículas e a ciclodextrina (oligossacarídeo), os quais tem sido testados para a utilização no tratamento da doença de Chagas (ARRÚA et al., 2019; LEONARDI; BOMBARDIERE; SALOMON, 2013; QUEZADA et al., 2019). Além dessas, outras abordagens também têm sido investigadas, como o uso de lipossomas, emulsões, auto-emulsões, micro-emulsões, micropartículas, sistemas líquidos entre outros (FERRAZ et al., 2018; GUPTA; KESARLA; OMRI, 2013; MAZZETI et al., 2020).

Outra característica importante a ser investigada é a capacidade de um composto em transpassar a barreira hematoencefálica. Nenhum composto demonstrou predisposição *in silico* para atravessá-la. Como a doença de Chagas não tem implicação direta em problemas do sistema nervoso central, é interessante que essas moléculas não a atravessem (UPADHYAY, 2014).

Além destas, também foi avaliada a ligação à glicoproteína P (P-gP). A P-gP é uma proteína de transporte que se localiza na membrana plasmática de diferentes células, principalmente naquelas envolvidas em eliminação de substâncias (BRINKMANN; EICHELBAUM, 2001). A interação dos compostos com essa proteína pode levar tanto à sua absorção, quanto a uma maior predisposição à interação droga-droga (LUND; PETERSEN; DALHOFF, 2017). A maioria dos compostos pode ser um substrato para essa proteína de transporte. Outras proteínas são envolvidas na depuração de fármacos, são elas as proteínas da superfamília do citocromo P450 (CYP), as quais possuem um grupamento Heme ligado à apoproteína por uma cisteína (URLACHER; GIRHARD, 2019). Inibir essas proteínas pode levar à interações medicamentosas, bem como ao acúmulo de medicamentos e/ou de seus metabólitos (GUENGERICH, 2008). Grande parte dos compostos testados não inibe as proteínas dessa família (com exceção da enzima

CYP3A4).

O *druglikeness* é um conceito que compara propriedades de moléculas (candidatos à fármacos) em desenvolvimento com fármacos que já foram aprovadas (MIGNANI et al., 2018). Existem diferentes regras que podem indicar que um composto possui bom *druglikeness*, como por exemplo as regras de Lipinski, Ghose, Vebber, Egan e Muegge. Se um composto viola alguns critérios destas regras, ele pode ter um menor potencial para ser implementado no mercado. Os compostos testados no presente projeto violaram de maneira variável alguns critérios destas regras previamente citadas.

Outro fator recentemente introduzido nesse contexto é o *score* de biodisponibilidade (SB). O SB é formulado como a probabilidade de um composto ter biodisponibilidade maior que 10% em ratos ou permeabilidade possível de ser mensurada em células Caco-2, levando em consideração fatores como por exemplo, a área de superfície polar das moléculas e a regra do cinco de Lipinski (MARTIN, 2005). A partir disso, é calculado o SB em que compostos que possuem *score* de 0,55 têm características de *druglikeness* e 0,17 não têm essas características. Apenas dois compostos obtiveram SB de 0,55, ou seja, possuem características compatíveis com *druglikeness* segundo esse índice, que foram JM-11 e JM-14.

Diferentes ensaios tanto *in silico*, *in vitro* quanto *in vivo* são necessários para se chegar a um efetivo tratamento medicamentoso. A toxicidade é um importante ponto a ser investigados nesse processo (PARASURAMAN, 2011), pois ajuda na predição de possíveis efeitos adversos que um determinado composto pode vir a causar (AROME; CHINEDU, 2013). Além disso, é considerada um ponto-chave na continuidade dos estudos pré-clínicos (ASTASHKINA; MANN; GRAINGER, 2012). Com isso, é importante testar o efeito dos compostos em diferentes células e em diferentes etapas do seu metabolismo, para ter uma visão mais ampla de sua ação frente aos diferentes tipos celulares.

Em nosso trabalho, optamos por testar a citotoxicidade frente a células do sistema imune como macrófagos e esplenócitos, pois um de nossos objetivos foi analisar a atividade imunomoduladora nessas células. Portanto, os compostos não deveriam ser tóxicos frente a essas células. Já os fibroblastos são as células mais encontradas no coração, um dos principais órgãos afetados pela doença, bem como são umas das células afetadas pela infecção por *T. cruzi* (BAUDINO et al., 2006; GUIMARÃES-PINTO et al., 2018). Além disso, os fibroblastos são as células utilizadas para os ensaios *in vitro* com as formas amastigotas, fazendo-se necessário verificar se os compostos não estão sendo

tóxicos para elas, o que influenciaria no resultado da atividade anti-amastigota. As células hepáticas são essenciais no metabolismo de xenobióticos e a testagem *in vitro* de toxicidade frente a esse tipo celular vem cada vez mais sendo encorajado (SOLDATOW et al., 2013).

Frente a hepatócitos, nenhum composto foi menos tóxico que a droga de referência. Dentre os outros 3 diferentes tipos celulares testados, a maioria dos compostos demonstrou ser menos tóxica que a droga de referência. Frente a esplenócitos e fibroblastos, a droga menos tóxica foi JM-11, já frente a macrófagos foi JM-14. A única diferença estrutural entre esses dois compostos é a presença de dois átomos de cloro como substituintes em JM-11. O JM-14 possui apenas um átomo de bromo como substituinte no primeiro anel benzênico. Além disso, foi observado que as moléculas preditas como atóxicas para células imunes pela base de dados ProTox-II, de fato foram atóxicas nos testes *in vitro* de citotoxicidade frente a esplenócitos.

Estes mesmos compostos apresentaram também uma predição *in silico* de alta absorção pelo TGI, sem atravessar a BHE, além de *score* de biodisponibilidade (SB) compatível com *druglikeness*. Esse conjunto de fatores indicam boas características de *druglikeness*. Vale salientar que a maioria dos compostos demonstrou valores de citotoxicidade bem variados entre os tipos celulares. Fica clara a importância de se testar o efeito dos compostos em diferentes células e em diferentes etapas do seu metabolismo, para ter uma visão mais ampla de sua ação frente aos diferentes tipos celulares.

Além da atividade citotóxica, é importante que se investigue a ação dos compostos frente às formas evolutivas de *T. cruzi*, pois espera-se que os compostos sejam mais ativos que a droga de referência (BUSTAMANTE; TARLETON, 2011). O composto LIZ-531 apresentou melhor IC₅₀ que a droga de referência frente a epimastigotas. Já para tripomastigotas, LIZ-311 demonstrou melhor atividade e, para amastigotas, LIZ-331.

A única diferença estrutural entre LIZ-311 e LIZ-331 é que o último possui um grupamento metóxi ligado ao último anel benzênico da estrutura do composto. Já LIZ-531 possui dois átomos de cloro no primeiro anel benzênico. Para que um composto seja ativo para amastigotas é importante que ele atravesse a barreira da célula que está infectada e posteriormente a barreira da membrana do amastigota. Brand e colaboradores (2017) observaram que compostos com maior número de grupamentos metóxi possuíam melhor atividade tripanocida. O mesmo ocorreu com derivados 1,3-tiazóis testados por Gomes e colaboradores (2016), em que foi visto melhora na atividade tripanocida no composto que possuía um grupamento metóxi em C4. Além disso, compostos derivados

da amidina testados contra *Leishmania amazonensis* aumentaram a sua atividade anti-amastigota quando possuíam esse grupamento como substituinte (TEMPORAL et al., 2005).

Como é possível notar pelos dados de lipofilicidade, o grupamento metóxi aumentou a lipofilicidade conferida a LIZ-331 em comparação a LIZ-311, o que pode auxiliar na sua ação anti-amastigota. Dos três melhores compostos para cada forma evolutiva, o composto LIZ-331 foi o que demonstrou melhor seletividade para o parasito em relação aos três tipos celulares testados.

Estudos demonstrando a importância do entendimento de como um composto interage com o sistema imune nos estudos para a doença de Chagas têm sido descritos (BRAZÃO et al., 2015). Nesse trabalho, buscamos entender como os compostos influenciam na produção de diferentes citocinas importantes no curso da doença de Chagas. O equilíbrio entre os perfis Th1 e Th2 é importante na imunopatogênese da doença de Chagas, sendo as citocinas do perfil Th1 consideradas protetoras e as do perfil Th2 sendo consideradas de suscetibilidade à doença de Chagas (GUEDES et al., 2009; KUMAR; TARLETON, 2001).

Enquanto a molécula LIZ-311 induziu de maneira significativa tanto citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-2) quanto citocinas anti-inflamatórias/regulatórias (IL-4, IL-10 e IL-17), LIZ-331 induziu apenas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6).

A citocina TNF- α , importante citocina do perfil Th1, junto com IL-12 e IFN- γ , leva a ativação da enzima iNOS na infecção inicial por *T. cruzi* com o objetivo de aumentar a produção de ON e controlar o parasitismo (MICHAILOWSKY et al., 2001). Corroborando com os resultados de dosagem de citocinas, o composto LIZ-311 também foi capaz de induzir a produção de ON. A depender da quantidade de IL-2 no microambiente, essa citocina tanto pode participar da ativação e diferenciação de linfócitos T CD8⁺ e células NK (LIAO; LIN; LEONARD, 2013), quanto atuar regulando positivamente a proliferação de linfócitos T regulatórios FoxP3⁺ (KOSMACZEWSKA, 2014). Esse papel dual demonstra a importância dessa citocina em um novo tratamento para a doença de Chagas (MENGEL; CARDILLO, PONTES-DE-CARVALHO, 2016).

É importante que um novo composto para a doença de Chagas possa induzir, além das moléculas pró-inflamatórias (para combater o parasito), as moléculas regulatórias para que não haja exacerbação da resposta imune. Isso porque já se sabe que a resposta imune pró-inflamatória exacerbada leva a maiores comprometimentos orgânicos na

doença de Chagas (FRADE-BARROS et al., 2020; NATALE et al., 2018).

A citocina IL-10 inibe a ativação de ERK1/2 e NF- κ B, levando à diminuição de TNF- α e IL-6 em cardiomiócitos infectados por *T. cruzi* (HOVSEPIAN et al., 2013). Aliado a isso, o eixo IL-10/STAT3/SOCS3 está envolvido na atividade anti-inflamatória do benzonidazol e é de extrema importância para sua atividade imunomoduladora (CEVEY et al., 2019). Um estudo conduzido por Jones e colaboradores (2018) verificou que a associação do benzonidazol com uma proteína de vacina recombinante (Tc24-C4) induziu uma resposta imune balanceada, pois levou ao aumento de produção de IFN- γ concomitantemente à produção de IL-4 e IL-10. Além disso, um estudo recente utilizando essa mesma estratégia de tratamento verificou que houve indução da resposta imune semelhante à Th17, com produção aumentada de IL-17A, IL-23 e IL-22, redução de inflamação cardíaca, fibrose e cargas parasitárias, além de melhorar a sobrevivência dos animais (CRUZ-CHAN et al., 2021).

É dentro desse contexto do equilíbrio de citocinas do perfil T auxiliar que está inserido o perfil Th17. A citocina IL-17 tem importante participação no combate a infecções, pois age recrutando e ativando neutrófilos, além de estimular a produção de mediadores inflamatórios como CXCL1, CXCL2 e G-CSF (GU; WU; LI, 2013; KUWABARA et al., 2017). Na fase aguda da doença de Chagas experimental, estudos demonstram que a IL-17 ajuda no combate à *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 deficientes na produção dessa citocina e infectados com *T. cruzi* possuíram menor índice de sobrevivência, maior parasitemia e falência múltipla de órgãos, além de menor produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-6 em comparação ao controle selvagem (MIYAZAKI et al., 2010). Já na fase crônica, estudos recentes vêm demonstrando que essa citocina pode ser um fator protetor para o miocárdio de pacientes com a doença de Chagas na fase crônica (SOUSA et al., 2017).

Com isso, fica clara a importância de um composto produzir de maneira equilibrada tanto citocinas pró-inflamatórias, quanto citocinas regulatórias para que leve a um melhor desfecho terapêutico na doença de Chagas, como foi o caso de LIZ-331.

A morte celular induzida pelo composto é um importante fator que deve ser investigado (ADADE et al., 2013; KEPP et al., 2011; MENNA-BARRETO et al., 2009). O termo “morte celular programada” (MCP) foi sugerido em 1964 e indica uma série de etapas que regem a morte celular não-acidental sem que haja inflamação (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1965). Uma dessas mortes celulares é a apoptose. Apesar de em tripanossomatídeos a MCP ainda não ser totalmente elucidada, sabe-se que os sinais de

apoptose são semelhantes aos encontrados em células de mamíferos, como externalização de fosfatidilserina e condensação e fragmentação anormal do DNA (DEBRABANT et al., 2003; DUSZENKO et al., 2006). Além disso, sabe-se que diferentes proteínas do parasito estão envolvidas no processo de apoptose, sendo elas associadas ao ciclo celular, proliferação e divisão celular, replicação de DNA entre outras (SMIRLIS et al., 2010).

É interessante que os compostos induzam apoptose, pois é um tipo de morte celular que leva a um menor processo inflamatório associado principalmente por não haver extravasamento intersticial de material intracelular, além das células que estão nesse processo de morte serem eliminadas rapidamente pelo sistema imune (DEBRABANT et al., 2003; ELMORE, 2007).

Foi investigado qual tipo de morte celular é induzido em tripomastigotas. O composto LIZ-311 induziu principalmente apoptose inicial, com maior porcentagem de parasitos marcados para esse tipo de morte. Ressalta-se que a droga de referência, benzonidazol, induziu de maneira significativa apoptose tardia em relação ao sem tratamento e em relação aos tratamentos com cada composto, tendo a maior porcentagem de parasitos marcados para esse tipo de morte celular. Ou seja, a droga de referência induz um maior desarranjo de membrana, levando a uma maior exposição do núcleo ao meio externo, o que pode ser prejudicial, pois pode levar a uma maior inflamação (GREEN; LLAMBI, 2015).

Objetivando esclarecer se os parasitos duplamente negativos no ensaio de marcação com a anexina V e o iodeto de propídio estavam, de fato, vivos, foi conduzido o ensaio de marcação parasitária com os marcadores calceína e homodímero de etídio. Verificou-se que houve uma menor porcentagem de parasitos vivos em comparação ao primeiro ensaio mencionado e confirmou-se que, excluindo-se as células vivas, a maior população era aquela em processo de morte celular (duplamente marcada). O ensaio com a calceína e o homodímero de etídio demonstrou ser mais sensível para detecção de morte celular. Este resultado corroborou com o estudo de Sandes e colaboradores (2014), em que este ensaio foi mais sensível em discriminar os parasitos vivos dos mortos.

Buscando uma melhor elucidação dos mecanismos de morte celular induzido pelas moléculas, foi feita a marcação parasitária com laranja de acridina e rodamina, marcadores de compartimentos ácidos, como reservossomos e acidocalcissomos, e de atividade mitocondrial respectivamente (DARZYNKIEWICZ; TRAGANOS; MELAMED, 1980; GARNER et al., 1997).

Após o tratamento com LIZ-311, foi verificada uma variação de fluorescência

para laranja de acridina de maneira dose-dependente. Com o aumento da concentração do composto houve uma diminuição da intensidade de fluorescência. Isso indica que quanto maior a concentração, menor a quantidade de compartimentos ácidos do parasito. Visto que tripomastigotas não possuem reservossomos (SOARES; DE SOUZA, 1991), uma possibilidade é a de que essa diminuição é dos acidocalcissomos. Outra possibilidade é a de que essa diminuição poderia ser devido a danos em ácidos nucleicos.

Já com relação à atividade mitocondrial, LIZ-311 parece diminuir a atividade dessa organela. Em tripanossomatídeos, essa organela está envolvida no estresse oxidativo, bem como na indução de morte celular e entre outras atividades celulares (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Ensaios futuros de microscopia confocal e microscopia eletrônica auxiliarão no melhor entendimento do mecanismo de morte celular.

Diante do exposto, fica claro o potencial dos compostos LIZ-331 e LIZ-311. A molécula LIZ-331 possui baixa toxicidade e perfil imunomodulador pró-inflamatório, enquanto LIZ-311 é pouco tóxica para as células testadas, com potencial imunomodulador *in silico* e *in vitro* (balanço Th1/Th2 e produção de ON), além de induzir a morte parasitária por via apoptótica.

Para que haja a eleição de um candidato à fármaco para a doença de Chagas ainda são necessários estudos mais aprofundados de atividade dentro dos ensaios pré-clínicos, como testes *in vivo* e posteriores ensaios clínicos (ROMANHA et al., 2010; SALES-JÚNIOR et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

- a) Com relação à predição computacional de farmacocinética: no geral os compostos são pouco hidrossolúveis e mais lipossolúveis; têm baixa possibilidade de atravessar tanto o trato gastrointestinal quanto a barreira hematoencefálica; parecem não ter problemas de interação com proteínas de depuração e não possuem boas características de *druglikeness*;
- b) Os compostos demonstraram uma maior afinidade computacional pelas enzimas esqualeno sintase e 14-alfa demetilase, sugerindo que possam ser importantes alvos da atividade biológica;
- c) Apesar das bases de dados sugerirem afinidade dos compostos pelas enzimas MAOA e B, *in vitro*, eles demonstraram baixa toxicidade;
- d) No *docking* de alvos do sistema imune, os compostos demonstraram maior afinidade para alvos da resposta imune inata, além de haver boa correlação dos resultados *in silico* e *in vitro* (imunomodulação) principalmente com aquelas citocinas envolvidas na produção de óxido nítrico (TNF- α e IFN- γ);
- e) Os compostos da série JM têm potencial imunomodulador *in silico*, abrindo a possibilidade de aprofundar o entendimento dessa atividade *in vitro*;
- f) Com relação a atividade tripanocida, um composto demonstrou melhor atividade (menor IC₅₀) em relação à droga de referência frente a epimastigotas (LIZ-531), um frente a tripomastigotas (LIZ-311) e um frente a amastigotas (LIZ-331);
- g) Além de destaque na atividade antiparasitária, LIZ-311 e LIZ-531 também induziram a produção de óxido nítrico;
- h) A molécula LIZ-311 induziu a produção tanto citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IFN- γ , IL-2) quanto citocinas anti-inflamatórias/regulatórias (IL-4, IL-10 e IL-17), enquanto LIZ-331 tem um perfil mais pró-inflamatório (TNF- α e IL-6);
- i) Com relação à morte celular, LIZ-311 induz principalmente morte celular programada, diminuindo a atividade mitocondrial e a quantidade de compartimentos ácidos parasitários;
- j) Diante do exposto, ficou demonstrado que o composto LIZ-311 possui interessante atividade antiparasitária, citotóxica, imunomoduladora e de indução de morte celular, sendo um potencial candidato à fármaco para a doença de Chagas, sendo necessários ainda estudos de atividade mais aprofundados.

7 PERSPECTIVAS

- Dosar óxido nítrico em macrófagos infectados com *T. cruzi* e estimulados com os compostos;
- Avaliar alterações da ultraestrutura de *T. cruzi*, além de realizar análises de microscopia confocal;
- Testes *in vitro* de combinação: LIZ-311 e LIZ-331 associados com o benzonidazol e também associados entre si;
- Teste *in vivo* combinando LIZ-311 com LIZ-331 ou benzonidazol. Esses testes só deverão ser realizados se as combinações forem sinérgicas *in vitro*;
- Teste *in vivo* com o LIZ-311 e LIZ-331 sozinhos;
- Publicação de artigos científicos;

REFERÊNCIAS

- ABEL, L. C. J. et al. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Journal of autoimmunity**, London, v. 17, n. 1, p. 99-107, 2001.
- ADADE, C. M. et al. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, Oxford, v. 69, p. 227-239, 2013.
- AGUIAR, C. et al. Serological profiles and evaluation of parasitoemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. **Tropical Medicine & International Health**, Oxford, v. 17, n. 3, p. 368-373, 2012.
- ALAM, Sarfaraz; KHAN, Feroz. QSAR, docking, ADMET, and system pharmacology studies on tormentic acid derivatives for anticancer activity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, v. 36, n. 9, p. 2373-2390, 2018.
- ALBAREDA, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. **International immunology**, Oxford, v. 18, n. 3, p. 465-471, 2006.
- ALCAIDE, Pilar; FRESNO, Manuel. The *Trypanosoma cruzi* membrane mucin AgC10 inhibits T cell activation and IL-2 transcription through L-selectin. **International immunology**, v. 16, n. 10, p. 1365-1375, 2004.
- ALDASORO, Edelweiss et al. What to expect and when: benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 4, p. 1060-1067, 2018.
- ALIBERTI, J. C. S et al. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon- γ -and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. **American journal of pathology**, New York, v. 158, n. 4, p. 1433-1440, 2001.
- ALONSO-VEGA, Cristina et al. New chemotherapy regimens and biomarkers for Chagas disease: The rationale and design of the TESEO study, an open-label, randomised, prospective, phase-2 clinical trial in the Plurinational State of Bolivia. **BMJ open**, v. 11, n. 12, p. e052897, 2021.
- ALQAHTANI, Saeed. In *silico* ADME-Tox modeling: progress and prospects. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 13, n. 11, p. 1147–1158, 2017. DOI 10.1080/17425255.2017.1389897. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/17425255.2017.1389897>.
- ÁLVAREZ, M. G. et al. Seronegative conversion after incomplete benznidazole treatment in chronic Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, n. 10, p. 636-638, 2012.

ÁLVAREZ, J. M. et al. Chagas disease: still many unsolved issues. **Mediators of inflammation**, New York, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/912965/>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

ÁLVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics**, Amsterdam, v. 1824, n. 1, p. 195-206, 2012.

ÁLVAREZ, Guzmán et al. Identification of a new amide-containing thiazole as a drug candidate for treatment of Chagas' disease. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 59, n. 3, p. 1398-1404, 2015.

ANDRADE, M. C. et al. Clinical and serological evolution in chronic Chagas disease patients in a 4-year pharmacotherapy follow-up: a preliminary study. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 46, n. 6, p. 776-778, 2013.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 8, n. 7, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003010>>. Acesso em: 20 jan. 2019

APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug design, development and therapy**, Auckland, v. 4, p. 243-253, 2010.

AROME, D.; CHINEDU, E. The importance of toxicity testing. **Journal of Pharmaceutical and Bioscience**, New York, v. 4, p. 146-148, 2013.

ARRÚA, Eva C. et al. Nanocarriers for effective delivery of benznidazole and nifurtimox in the treatment of chagas disease: A review. **Acta Tropica**, v. 198, n. July, p. 105080, 2019. DOI 10.1016/j.actatropica.2019.105080. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105080>.

ASTASHKINA, A.; MANN, B.; GRAINGER, D. W. A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. **Pharmacology & therapeutics**, Oxford, v. 134, n. 1, p. 82-106, 2012.

AYO, C. M. et al. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. **BioMed research international**, Cairo, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3771244/pdf/BMRI2013-284729.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2019.

BAFICA, Andre et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 177, n. 6, p. 3515-3519, 2006.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G. et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14–30 years ago. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 182, n. 2, p. 634-638, 2000.

- BANERJEE, Priyanka et al. ProTox-II: a webserver for the prediction of toxicity of chemicals. **Nucleic acids research**, v. 46, n. W1, p. W257-W263, 2018.
- BARR, S. C. et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 12, p. 5160-5161, 2005.
- BATISTA, C. M. et al. *Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reserosomes. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0130165, 2015.
- BASSO, B. Modulation of immune response in experimental Chagas disease. **The world journal of experimental medicine**, Pleasanton, v. 3, n. 1, p. 1-10, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3905588/>>. Acesso em: 03 jul. 2019.
- BAUDINO, Troy A. et al. Cardiac fibroblasts: Friend or foe? **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, 2006. DOI 10.1152/ajpheart.00023.2006.
- BELLERA, C. L. et al. Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 93, p. 338-348, 2015.
- BERMUDEZ, J. et al. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta tropica**, Basel, v. 156, p. 1-16, 2016.
- BERN, Caryn et al. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States. **Clinical microbiology reviews**, v. 24, n. 4, p. 655-681, 2011.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.
- BOARI, J. T. et al. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3343119/>>. Acesso em: 16 jun. 2019.
- BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: Secretaria de Vigilância em Saúde, v. 46, n. 21, mar. 2015. Disponível em: <<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2018.
- BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat?. **Parasite**, Paris, v. 21, n. 11, 2014.
- BONNEY, K. M.; ENGMAN, D. M. Autoimmune pathogenesis of Chagas heart disease: looking back, looking ahead. **American journal of pathology**, New York, v. 185, n. 6, p. 1537-1547, 2015.
- BOSQUESI, P. L. et al. Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 3, p. 231-238, 2008.

BRAND, Stephen et al. Discovery and Optimization of 5-Amino-1, 2, 3-triazole-4-carboxamide Series against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 17, p. 7284-7299, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacao-epidemiologica>>. Acesso em: 17 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Ministério da Saúde. Boletim epidemiológico**, v. 50, p. 10, 2019. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/23/2018-025.pdf>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 218, de 29 jul 2005. Dispõe sobre o regulamento técnico de procedimento higiênico sanitários para manipulação de alimentos e bebidas preparados com vegetais. **Diário Oficial da União**. 30 jul 2005. Disponível em: <https://www.saude.rj.gov.br/comum/code/MostrarArquivo.php?C=MjA0NA%2C%2C>. Acesso em: 20 jan. 2019.

BRASIL. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA. Sistema de produção do açaí. Brasília, DF: **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/408196/acai>. Acesso em: 9 nov. 2019

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas Doença de Chagas, 2018. Disponível em: <http://conitec.gov.br/images/Protocolos/Relatorio_PCDT_Doenca_de_Chagas.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> [Acesso em 27 de janeiro de 2022].

BRAZÃO, V. et al. Immunomodulatory properties and anti-apoptotic effects of zinc and melatonin in an experimental model of chronic Chagas disease. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 220, n. 5, p. 626-633, 2015.

BRINKMANN, U.; EICHELBAUM, M. Polymorphisms in the ABC drug transporter gene MDR1. **The pharmacogenomics journal**, v. 1, n. 1, p. 59-64, 2001.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, Nazlee. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Current opinion in infectious diseases**, London, v. 23, n. 6, p. 609-616, 2010.

BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. **Expert opinion on drug discovery**, London, v. 6, n. 6, p. 653-661, 2011.

CAI, C. W. et al. Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 12, n. 10, 2016. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1005902>>. Acesso em: 08 mai. 2019.

CAL, Monica et al. Assessing anti-*T. cruzi* candidates in vitro for sterile cidal activity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 165-170, 2016.

CAMPI-AZEVEDO, A. C. et al. Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 220, n. 5, p. 564-574, 2015.

CAMPO, V. L. et al. Design, synthesis and the effect of 1, 2, 3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v. 20, n. 1, p. 145-156, 2012.

CAMPOS, Marco AS et al. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 1, p. 416-423, 2001.

CAMPOS, Mônica CO et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: evidence that distinct mechanisms can act in concert. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 193, n. 1, p. 17-19, 2014.

CAZZULO, J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 2, n. 11, p. 1261-1271, 2002.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos da América). **Biology**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos da América). **Antiparasitic Treatment**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html>. Acesso em: 7 jan. 2019.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos da América). **Treatment**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/treatment.html>>. Acesso em: 7 jan. 2019.

CEVEY, Ágata C. et al. IL-10/STAT3/SOCS3 axis is involved in the anti-inflammatory effect of benznidazole. **Frontiers in immunology**, v. 10, p. 1267, 2019.

CHAAR, B. B. Medicine shortages: Implications for the Australian healthcare system. **The Australasian medical journal**, Ontario, v. 7, n. 3, p. 161-163, 2014.

CHAO, María N. et al. Selenium-containing analogues of WC-9 are extremely potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* proliferation. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, n. 24, p. 6435-6449, 2017.

CHAO, María N. et al. Further insights of selenium-containing analogues of WC-9 against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1350-1361, 2019.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of biomolecular screening**, Larchmont, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

CHATELAIN, Eric; IOSET, Jean-Robert. Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 13, n. 2, p. 141-153, 2018.

CHATELAIN, E.; KONAR, N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. **Drug design, development and therapy**, Auckland, v. 9, p. 4807-4823, 2015.

COSTA, R. P. et al. T-Cell Repertoire Analysis in Acute and Chronic Human Chagas' Disease: Differential Frequencies of Vb5 Expressing T Cells. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 51, n. 5, p. 511-519, 2000.

COSTA, Elenild de Góes et al. Acute Chagas disease in the Brazilian Amazon: epidemiological and clinical features. **International journal of cardiology**, v. 235, p. 176-178, 2017.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, London, v. 465, p. S6-S7, 2010.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

CRIADO, L. et al. Genetic polymorphisms in TNF/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. **Cytokine**, San Diego, v. 57, n. 3, p. 398-401, 2012.

CRISTOVÃO-SILVA, Ana Catarina; BRELAZ-DE-CASTRO, Maria Carolina Accioly. Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 873, 2019.

CRUZ-CHAN, Julio V. et al. Vaccine-linked chemotherapy induces IL-17 production and reduces cardiac pathology during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Scientific reports**, v. 11, n. 1, p. 1-13, 2021.

DA CONCEIÇÃO, Juliana Maria. **Planejamento estrutural, síntese e avaliação da atividade leishmanicida de novos 1,3-tiazóis**. 67f. 173f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

DAFF, Simon. NO synthase: structures and mechanisms. **Nitric oxide**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2010.

DA FONSECA, Leonardo Marques et al. Theft and Reception of Host Cell's Sialic Acid: Dynamics of *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidases and Mucin-Like Molecules on Chagas' Disease Immunomodulation. **Frontiers in immunology**, v. 10, 2019.

DAINA, Antoine; MICHIELIN, Olivier; ZOETE, Vincent. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. **Scientific reports**, v. 7, p. 42717, 2017.

DARANI, Hossein Yousofi et al. Parasites and immunotherapy: with or against?. **Journal of parasitic diseases**, v. 40, n. 2, p. 217-226, 2016.

DARZYNKIEWICZ, Zbigniew; TRAGANOS, Frank; MELAMED, Myron R. New cell cycle compartments identified by multiparameter flow cytometry. **Cytometry**, v. 1, n. 2, p. 98-108, 1980. DOI 10.1002/cyto.990010203.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Potential role of CD4⁺ CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, v. 12, p. 2797-2806, 2006.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Characterization of the presence of Foxp3⁺ T cells from patients with different clinical forms of Chagas' disease. **Human pathology**, Philadelphia, v. 42, n. 2, p. 299-302, 2011.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Foxp3⁺ CD25^{high} CD4⁺ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 768-777, 2012.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Regulatory T cells phenotype in different clinical forms of Chagas' disease. **PLoS neglected tropical diseases**, São Francisco, v. 5, n. 5, 2011. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000992>>. Acesso em: 25 mai. 2019.

DE ASSIS, Diego Rodney Rodrigues et al. 4-chlorophenylthioacetone-derived thiosemicarbazones as potent antitrypanosomal drug candidates: investigations on the mode of action. **Bioorganic Chemistry**, p. 105018, 2021.

DEBRABANT, A. et al. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. **International journal for parasitology**, New York, v. 33, n. 3, p. 257-267, 2003.

DE BONA, Elidiana et al. Autoimmunity in chronic Chagas disease: a road of multiple pathways to cardiomyopathy?. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1842, 2018.

DELANO, Warren L. The PyMOL user's manual, 2002.

DE OLIVEIRA FILHO, Gevanio Bezerra et al. Structural Design, Synthesis and Anti-Trypanosoma cruzi profile of the second generation of 4-Thiazolidinones chlorine derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 345, p. 109514, 2021.

DE SOUZA, Wanderley; VIDAL, Juliana. **Taxonomia**, 2017. Disponível em <<http://chagas.fiocruz.br/taxonomia/>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

DHIMAN, M. et al. Innate immune responses and antioxidant/oxidant imbalance are major determinants of human Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 7, n. 8, 2013. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0002364>>. Acesso em: 15 ago. 2019.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso brasileiro em doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, p. 7-86, 2016.

DÍAZ, Pablo Ruiz et al. Trypanosoma cruzi trans-sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and downregulates Th1 effector cells. **Infection and immunity**, v. 83, n. 5, p. 2099-2108, 2015.

DINIZ, Livia de Figueiredo et al. Outcome of E1224-benznidazole combination treatment for infection with a multidrug-resistant Trypanosoma cruzi strain in mice. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. e00401-18, 2018.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.

DOCAMPO, Roberto; MORENO, Silvia NJ. Acidocalcisomes. **Cell calcium**, v. 50, n. 2, p. 113-119, 2011.

DOCAMPO, Roberto; HUANG, Guozhong. Calcium signaling in trypanosomatid parasites. **Cell calcium**, v. 57, n. 3, p. 194-202, 2015.

DOS-SANTOS, A. L. A. et al. Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections. **Experimental parasitology**, New York, v. 167, p. 67-75, 2016.

DOYLE, Patricia S. et al. A cysteine protease inhibitor cures Chagas' disease in an immunodeficient-mouse model of infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3932-3939, 2007.

DOYLE, Patricia S. et al. The Trypanosoma cruzi protease cruzain mediates immune evasion. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 9, 2011.

DRIGO, S. A. et al. TNF- α gene polymorphisms are associated with reduced survival in severe Chagas' disease cardiomyopathy patients. **Microbes and Infection**, Paris, v. 8, n. 3, p. 598-603, 2006.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (Estados Unidos da América). **Tratamentos atuais**. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas/tratamentos-atuais.html>>. Acesso em: 29 dez. 2019.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (Estados Unidos da América). **Target Product Profile**. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-target-product-profile/>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (Estados Unidos da América) (2019). Disponível em: <https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2019/03/2page_BenditStudyOverview_ENG.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2019.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (Estados Unidos da América) (2014). **K777 (Chagas)**. Disponível em: <<https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/k777/>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

- DRWAL, Malgorzata N. et al. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. **Nucleic acids research**, v. 42, n. W1, p. W53-W58, 2014.
- DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thio semicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of medicinal chemistry**, Easton, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002.
- DUBNER, S. et al. Chagas disease: state-of-the-art of diagnosis and management. **Cardiology journal**, Gdańsk, v. 15, n. 6, p. 493-504, 2008.
- DURRANT, Jacob D.; MCCAMMON, J. Andrew. BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 29, n. 6, p. 888-893, 2011.
- DUSZENKO, M. et al. Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 22, n. 11, p. 536-542, 2006.
- DUTRA, W. O. et al. Self and non-self stimulatory molecules induce preferential expansion of CD-5+ B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 51, n. 1, p. 91-97, 2000.
- DUTRA, W. O. et al. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 208-218, 2009.
- DUTRA, W. O. et al. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite immunology**, Oxford, v. 36, n. 8, p. 377-387, 2014.
- DURANTE, I. M.; CÁMARA, M. L. M.; BUSCAGLIA, C. A. A novel *Trypanosoma cruzi* protein associated to the flagellar pocket of replicative stages and involved in parasite growth. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 6, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0130099>>. Acesso em: 19 out. 2019.
- EGAN, William J.; MERZ, Kenneth M.; BALDWIN, John J. Prediction of drug absorption using multivariate statistics. **Journal of medicinal chemistry**, v. 43, n. 21, p. 3867-3877, 2000.
- ENGEL, Juan C. et al. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 4, p. 725-734, 1998.
- ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta tropica**, Basel, v. 81, n. 2, p. 123-132, 2002.
- ELMORE, S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, Lawrence, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.
- ESPÍNDOLA, J. W. P. **Síntese de derivados hidrazônicos como possíveis candidatos a inseticidas larvais frente ao *Aedes aegypti* e a fármacos para o tratamento da doença de Chagas**. 173f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

ESPÍNDOLA, J. W. P. et al. Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 101, p. 818-835, 2015.

FAIRLAMB, Alan H. et al. Drug resistance in eukaryotic microorganisms. **Nature microbiology**, v. 1, n. 7, p. 1-15, 2016.

FARAL-TELLO, Paula et al. Imidazolium compounds are active against all stages of *Trypanosoma cruzi*. **International journal of antimicrobial agents**, Amsterdam, v. 43, n. 3, p. 262-268, 2013.

FAURO, Romina et al. Use of clomipramine as chemotherapy of the chronic phase of Chagas disease. **Parasitology**, v. 140, n. 7, p. 917-927, 2013.

FERNANDES, M. C.; ANDREWS, N. W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence. **FEMS microbiology reviews**, Amsterdam, v. 36, n. 3, p. 734-747, 2012.

FERREIRA, L. R. et al. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World Journal of Cardiology**, Pleasanton, v. 6, n. 8, p. 782-790, 2014.

FERREIRA, L. G., et al. Molecular docking and structure-based drug design strategies. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 7, p. 13384-13421, 2015.

FERREIRA, R. S; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. et al. Integração das técnicas de triagem virtual e triagem biológica automatizada em alta escala: oportunidades e desafios em P&D de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 10, p. 1770-1778, 2011.

FERRAZ, M. L. et al. The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, Washington, v. 51, n. 4, p. 1359-1364, 2007.

FERRAZ, Leslie Raphael de Moura et al. Technological innovation strategies for the specific treatment of Chagas disease based on Benznidazole. **Acta Tropica**, v. 185, p. 127–132, 2018. DOI 10.1016/j.actatropica.2018.02.008.

FIDALGO, Lianet Monzote; GILLE, Lars. Mitochondria and trypanosomatids: Targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n. 11, p. 2758–2770, 2011. DOI 10.1007/s11095-011-0586-3.

FIELD, M.C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 15, n. 4, p.217-231, 2017.

FLOHÉ, Leopold. The trypanothione system and its implications in the therapy of trypanosomatid diseases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4-5, p. 216-220, 2012.

FOTI, Robert S.; DALVIE, Deepak K. Cytochrome P450 and non-cytochrome P450 oxidative metabolism: Contributions to the pharmacokinetics, safety, and efficacy of xenobiotics. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 44, n. 8, p. 1229–1245, 2016. DOI 10.1124/dmd.116.071753.

- FRADE, A. F. et al. Genetic susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy: involvement of several genes of the innate immunity and chemokine-dependent migration pathways. **BMC infectious diseases**, London, v. 13, n. 1, p. 587-604, 2013.
- FRADE-BARROS, Amanda Farage et al. Polymorphisms in genes affecting interferon- γ production and Th1 T cell differentiation are associated with progression to Chagas disease cardiomyopathy. **Frontiers in immunology**, v. 11, p. 1386, 2020.
- FRAGATA-FILHO, A. A. et al. Evaluation of parasiticide treatment with benznidazol in the electrocardiographic, clinical, and serological evolution of Chagas disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 3, 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004508>>. Acesso em: 01 nov. 2019.
- FRANCISCO, Amanda F. et al. Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1871-1880, 2017.
- GUENGERICH, Fred Peter. Cytochrome p450 and chemical toxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 1, p. 70-83, 2008.
- GALVÃO, C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, Auckland, v. 202, p. 1-36, 2003.
- GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International journal for parasitology**, New York, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2002.
- GARNER, Duane L. et al. Fluorometric Assessments of Mitochondrial Function and Viability in Cryopreserved Bovine Spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 57, n. 6, p. 1401-1406, 1997. DOI 10.1095/biolreprod57.6.1401.
- GAZZINELLI, Ricardo T.; DENKERS, Eric Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895-906, 2006.
- GELDENHUYS, W. J. et al. Optimizing the use of open-source software applications in drug discovery. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 11, n. 3-4, p. 127-132, 2006.
- GHOSE, Arup K.; VISWANADHAN, Vellarkad N.; WENDOLOSKI, John J. A knowledge-based approach in designing combinatorial or medicinal chemistry libraries for drug discovery. 1. A qualitative and quantitative characterization of known drug databases. **Journal of combinatorial chemistry**, v. 1, n. 1, p. 55-68, 1999.
- GILBERT, I. H. Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches: miniperspectives series on phenotypic screening for anti-infective targets. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 56, n. 20, p. 7719-7726, 2013.
- GIORGI, M. E. et al. Improved bioavailability of inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: PEGylation of lactose analogs with multiarm polyethyleneglycol. **Glycobiology**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 1363-1373, 2012.

GUEDES, P. M. M. et al. Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic chagas disease patients. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 10, n. 4, 2016. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0004669>>. Acesso em: 9 abr. 2019.

GUEDES, Isabella A.; DE MAGALHÃES, Camila S.; DARDENNE, Laurent E. Receptor–ligand molecular docking. **Biophysical reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-87, 2014.

GUIMARÃES-PINTO, Kamila et al. Trypanosoma cruzi infection induces cellular stress response and senescence-like phenotype in murine fibroblasts. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. JUL, p. 1–11, 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.01569.

GUPTA, S.; WEN, J.; GARG, N. J. Oxidative stress in Chagas disease. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, Cairo, v. 2009, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2696642/pdf/IPID2009-190354.pdf>>. Acesso em 8 mai. 2019.

GUPTA, Shweta; KESARLA, Rajesh; OMRI, Abdelwahab. Formulation Strategies to Improve the Bioavailability of Poorly Absorbed Drugs with Special Emphasis on Self-Emulsifying Systems. **ISRN Pharmaceutics**, v. 2013, p. 1–16, 2013. DOI 10.1155/2013/848043.

GUPTA, Amit et al. Novel 4-thiazolidinone derivatives as anti-infective agents: synthesis, characterization, and antimicrobial evaluation. **Biochemistry research international**, v. 2016, 2016.

GUTIERREZ, F. R. S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 236-245, 2009.

HENAO-MARTÍNEZ, A. F.; SCHWARTZ, D. A.; YANG, I. V. Chagasic cardiomyopathy, from acute to chronic: is this mediated by host susceptibility factors?. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 106, n. 9, p. 521-527, 2012.

HIYAMA, Kazutoshi et al. IL-4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology Research**, v. 87, n. 4, p. 269-274, 2001.

HOVSEPIAN, Eugenia et al. IL-10 inhibits the NF-κB and ERK/MAPK-mediated production of pro-inflammatory mediators by up-regulation of SOCS-3 in *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes. **PloS one**, v. 8, n. 11, p. e79445, 2013.

HYLAND, K. V. et al. Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 7, p. 3641-3650, 2007.

JOHNSON, Titilayo Omolara et al. Biochemical evaluation and molecular docking assessment of the anti-inflammatory potential of *Phyllanthus nivosus* leaf against ulcerative colitis. **Heliyon**, v. 6, n. 5, p. e03893, 2020.

JONES, Kathryn et al. Vaccine-linked chemotherapy improves benznidazole efficacy for acute Chagas disease. **Infection and immunity**, v. 86, n. 4, p. e00876-17, 2018.

- KANIA, G. et al. Innate signalling promotes formation of regulatory nitric oxide-producing dendritic cells limiting T cell expansion in experimental autoimmune myocarditis. **Circulation**, Dallas, v. 171, n. 23, p. 2285-2294, 2013.
- KAYAMA, H.; TAKEDA, K. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and infection**, Paris, v. 12, n. 7, p. 511-517, 2010.
- KEISER, Michael J. et al. Relating protein pharmacology by ligand chemistry. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 2, p. 197–206, 2007. DOI 10.1038/nbt1284. .
- KEPP, O. et al. Cell death assays for drug discovery. **Nature reviews Drug discovery**, London, v. 10, n. 3, p. 221-237, 2011.
- KESSLER, R. L. et al. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 104, n. 5, p. 712-736, 2017.
- KOBYLINSKA, L. I. et al. Putative anticancer potential of novel 4-thiazolidinone derivatives: cytotoxicity toward rat C6 glioma in vitro and correlation of general toxicity with the balance of free radical oxidation in rats. **Croatian medical journal**, Zagreb, v. 57, n. 2, p. 151-163, 2016.
- KOSMACZEWSKA, Agata. Low-dose interleukin-2 therapy: a driver of an imbalance between immune tolerance and autoimmunity. **International journal of molecular sciences**, v. 15, n. 10, p. 18574-18592, 2014.
- KRATZ, Jadel Müller et al. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 11, n. 10, p. 943-957, 2018.
- KRIEGER, S. et al. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular microbiology**, v. 35, n. 3, p. 542-552, 2000.
- KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 166, n. 7, p. 4596-4603, 2001.
- KUWABARA, T. et al. The role of IL-17 and related cytokines in inflammatory autoimmune diseases. **Mediators of inflammation**, v. 2017, 2017. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/3908061/>>. Acesso em: 11 jan. 2022.
- LANGOUSIS, G; HILL, K. L. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. **Nature reviews Microbiology**, London, v. 12, n. 7, p. 505-518, 2014.
- LEELANANDA, Sumudu P.; LINDERT, Steffen. Computational methods in drug discovery. **Beilstein journal of organic chemistry**, v. 12, n. 1, p. 2694-2718, 2016.
- LEITE, A. C. L. et al. Synthesis, Cruzain Docking, and *in vitro* Studies of Aryl-4-Oxothiazolylhydrazones Against *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 2, n. 9, p. 1339-1345, 2007.
- LEITE, A. C. L. et al. Privileged structures in the design of potential drug candidates for neglected diseases. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 23, p. 4323-4354, 2019.

LEONARDI, D.; BOMBARDIERE, M. E.; SALOMON, C. J. Effects of benznidazole: Cyclodextrin complexes on the drug bioavailability upon oral administration to rats. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 62, p. 543–548, 2013. DOI 10.1016/j.ijbiomac.2013.10.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.10.007>.

LEPESHEVA, Galina I. et al^a. Structural insights into inhibition of sterol 14 α -demethylase in the human pathogen *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 33, p. 25582-25590, 2010.

LEPESHEVA, Galina I. et al^b. Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14 α -demethylase and implications for selective treatment of human infections. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 3, p. 1773–1780, 2010. DOI 10.1074/jbc.M109.067470.

LEPESHEVA, Galina I.; VILLALTA, Fernando; WATERMAN, Michael R. Targeting *Trypanosoma cruzi* sterol 14 α -demethylase (CYP51). In: **Advances in parasitology**. Academic Press, 2011. p. 65-87.

LIAO, Wei; LIN, Jian-Xin; LEONARD, Warren J. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. **Immunity**, v. 38, n. 1, p. 13-25, 2013.

LIMA, L. et al. Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and allied species. **Protist**, Jena, v. 163, n. 6, p. 856-872, 2012.

LIÑARES, Guadalupe García. New Approaches for Chagas' Disease Chemotherapy. In: Chagas Disease-Basic Investigations and Challenges. **IntechOpen**, 2018.

LIPINSKI, Christopher A. et al. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. **Advanced drug delivery reviews**, v. 23, n. 1-3, p. 3-25, 1997.

LIU, G.; ZHAO, Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells. **Immunology**, Oxford, v. 122, n. 2, p. 149-156, 2007.

LIU, Dong et al. The smart drug delivery system and its clinical potential. **Theranostics**, v. 6, n. 9, p. 1306–1323, 2016. DOI 10.7150/thno.14858.

LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death—I. Cytology of degeneration in the intersegmental muscles of the Pernyi silkworm. **Journal of insect physiology**, Oxford, v. 11, n. 2, p. 123-133, 1965.

LO PRESTI, M. S. L. et al. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. **Acta tropica**, Basel, v. 145, p. 79-87, 2015.

LUND, Marie; PETERSEN, Tonny Studsgaard; DALHOFF, Kim Peder. Clinical Implications of P-Glycoprotein Modulation in Drug–Drug Interactions. **Drugs**, v. 77, n. 8, p. 859–883, 2017. DOI 10.1007/s40265-017-0729-x.

- MACHADO, F. S. et al. *Trypanosoma cruzi*–infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide–dependent trypanocidal activity. **Circulation**, Dallas, v. 102, n. 24, p. 3003-3008, 2000.
- MACHADO, F. S. et al. Nitric oxide synthase-2 modulates chemokine production by *Trypanosoma cruzi*-infected cardiac myocytes. **Microbes and infection**, Paris, v. 10, n. 14, p. 1558-1566, 2008.
- MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **In: Seminars in immunopathology**, Berlim, v. 34, n. 6, p. 753-770, 2012.
- MACHADO, F. S. et al. Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, Searington, v. 4, p. 1743-1758, 2013.
- MACLEAN, Lorna M. et al. Development of *Trypanosoma cruzi* in vitro assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug discovery. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 7, p. e0006612, 2018.
- MAGALHÃES, L. M. D. et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 207, p. 661-665, 2012.
- MAGALHÃES, L. M. D. et al. Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003816>>. Acesso em: 30 abr. 2019.
- MALTAROLLO, Vinícius Gonçalves et al. Applying machine learning techniques for ADME-Tox prediction: a review. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 11, n. 2, p. 259-271, 2015.
- MARIN-NETO, J. Antonio et al. The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 319-324, jul. 2009.
- MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunological reviews**, Copenhagen, v. 201, n. 1, p. 304-317, 2004.
- MARTIN, Yvonne C. A bioavailability score. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 3164–3170, 2005. DOI 10.1021/jm0492002.
- MARTÍN-ESCOLANO, Javier; MEDINA-CARMONA, Encarnación; MARTÍN-ESCOLANO, Rubén. Chagas disease: Current view of an ancient and global chemotherapy challenge. **ACS Infectious Diseases**, v. 6, n. 11, p. 2830-2843, 2020.
- MARTINEZ-MAYORGA, Karina et al. Cruzain inhibitors: efforts made, current leads and a structural outlook of new hits. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 7, p. 890-898, 2015.
- MATEUS, Jose et al. Antiparasitic treatment induces an improved CD8⁺ T cell response

in chronic chagasic patients. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 8, p. 3170-3180, 2017.

MAZZETI, Ana Lia et al. Benznidazole Self-Emulsifying Delivery System: A Novel Alternative Dosage Form For Chagas Disease Treatment. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 105234, 2020. DOI 10.1016/j.ejps.2020.105234. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejps.2020.105234>.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. Laboratório brasileiro deixa milhares sem tratamento contra doença de Chagas. **Médicos Sem Fronteiras**, Bolívia, 5 de out. 2011. Disponível em: <https://www.msf.org.br/noticias/laboratorio-brasileiro-deixa-milhares-sem-tratamento-contra-doenca-de-chagas/>. Acesso em: 19 de fev. 2020.

MEJIA, Ana Maria et al. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **The Journal of infectious diseases**, v. 206, n. 2, p. 220-228, 2012.

MENEZES, C. A. S. et al. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28– cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. **Clinical & Experimental Immunology**, London, v. 137, n. 1, p. 129-138, 2004.

MENGEL, Jose; CARDILLO, Fabíola; PONTES-DE-CARVALHO, Lain. Chronic Chagas' disease: targeting the interleukin-2 axis and regulatory T cells in a condition for which there is no treatment. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 675, 2016.

MENNA-BARRETO, R. F. S et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009.

MENNA-BARRETO, Rubem Figueiredo Sadok; DE CASTRO, Solange Lisboa. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. DOI 10.1155/2014/614014.

MESAIK, M. Ahmed et al. Biological and molecular docking studies on coagulin-H: Human IL-2 novel natural inhibitor. **Molecular immunology**, v. 43, n. 11, p. 1855-1863, 2006.

MICHAILEWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon- γ axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **The American journal of pathology**, New York, v. 159, n. 5, p. 1723-1733, 2001.

MICHELS, P. A. M. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular cell research**, Amsterdam, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, 2006.

MIGNANI, Serge et al. Present drug-likeness filters in medicinal chemistry during the hit and lead optimization process: how far can they be simplified? **Drug Discovery Today**, v. 23, n. 3, p. 605–615, 2018. DOI 10.1016/j.drudis.2018.01.010.

- MILLER, B. R.; ROITBERG, A. E. Design of e-pharmacophore models using compound fragments for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*: screening for novel inhibitor scaffolds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 45, p. 84-97, 2013.
- MIYAZAKI, Y. et al. IL-17 is necessary for host protection against acute-phase *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 1150-1157, 2010.
- MOLINA, Israel et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899-1908, 2014.
- MORAES, C. B. et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific reports**, v. 4, p. 4703, 2014.
- MOREIRA, D. R. M. et al. Structural investigation of anti-*Trypanosoma cruzi* 2-iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 24, p. 10918-10936, 2012.
- MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, London, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.
- MORILLO, C. A. et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 14, p. 1295-1306, 2015.
- MORILLO, Carlos A. et al. Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: the STOP-CHAGAS trial. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939-947, 2017.
- MUEGGE, Ingo; HEALD, Sarah L.; BRITTELLI, David. Simple selection criteria for drug-like chemical matter. **Journal of medicinal chemistry**, v. 44, n. 12, p. 1841-1846, 2001.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, Maria Angeles; FERNÁNDEZ, Monica A.; FRESNO, Manuel. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF- α and IFN- γ through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunology letters**, v. 33, n. 1, p. 35-40, 1992.
- NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 634-643, 2012.
- NAKAMURA, Yutaka et al. Docking analysis and the possibility of prediction efficacy for an anti-IL-13 biopharmaceutical treatment with tralokinumab and lebrikizumab for bronchial asthma. **PloS one**, v. 12, n. 11, p. e0188407, 2017.
- NARDY, Ana Flávia; FREIRE-DE-LIMA, Célio Geraldo; MORROT, Alexandre. Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of immunology research**, v. 2015, 2015.

NATALE, María A. et al. Correction: Trypanosoma cruzi-specific IFN- γ -producing cells in chronic Chagas disease associate with a functional IL-7/IL-7R axis. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 2, p. e0007168, 2018.

NAVARRO, M. et al. Benznidazole shortage makes Chagas disease a neglected tropical disease in developed countries: data from Spain. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 87, n. 3, p. 489-490, 2012.

NEWBY, Danielle; FREITAS, Alex A.; GHAFOURIAN, Taravat. Decision trees to characterise the roles of permeability and solubility on the prediction of oral absorption. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 90, p. 751–765, 2015. DOI 10.1016/j.ejmech.2014.12.006.

NGUEWA, Paul A. et al. Programmed cell death in trypanosomatids: a way to maximize their biological fitness?. **Trends in parasitology**, v. 20, n. 8, p. 375-380, 2004.

NOGUEIRA, L. G. et al. Functional IL18 polymorphism and susceptibility to Chronic Chagas Disease. **Cytokine**, San Diego, v. 73, n. 1, p. 79-83, 2015.

OLIVEIRA, Ana-Carolina et al. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to Trypanosoma cruzi glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with T. cruzi. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 9, p. 5688-5696, 2004.

OLIVEIRA, Ana-Carolina et al. Impaired innate immunity in Tlr4^{-/-} mice but preserved CD8⁺ T cell responses against Trypanosoma cruzi in Tlr4^{-/-}, Tlr2^{-/-}, Tlr9^{-/-}-or Myd88-deficient mice. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 4, 2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Geneva, 2015. (Fact sheets, n. 340). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em 18 mar. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Weekly epidemiological record (WER)**. Geneva, 2015, v. 90, n. 6, p. 33-44. Disponível em: <<http://www.who.int/wer/2015/en/>>. Acesso em: 22 dez. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control of Chagas disease: Second report of the WHO Expert Committee**. Geneva, 2002. (Technical report series, n. 905). Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/handle/10665/42443>>. Acesso em: 28 dez. 2019.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Epidemiology**. Geneva, 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>>. Acesso em: 28 dez. 2019.

OVERINGTON, J. P.; AL-LAZIKANI, B.; HOPKINS, A. L. How many drug targets are there?. **Nature reviews Drug discovery**, London, v. 5, n. 12, p. 993, 2006.

PADILLA, A. M.; BUSTAMANTE, J. M.; TARLETON, R. L. CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Current opinion in immunology**, Philadelphia, v. 21, n. 4, p. 385-390, 2009.

- PAES, L. S. et al. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to target new drugs against chagas disease. **Current pharmaceutical design**, Schiphol, v. 17, n. 20, p. 2074-2099, 2011.
- PAPADOPOULOU, M. V. et al. Novel 3-nitro-1 H-1, 2, 4-triazole-based compounds as potential anti-Chagasic drugs: *in vivo* studies. **Future medicinal chemistry**, London, v. 5, n. 15, p. 1763-1776, 2013.
- PAPADOPOULOU, Maria V. et al. Novel 3-nitrotriazole-based amides and carbinols as bifunctional antichagasic agents. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 58, n. 3, p. 1307-1319, 2015.
- PAPADOPOULOU, M. V. et al. Nitrotriazole-based acetamides and propanamides with broad spectrum antitrypanosomal activity. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 123, p. 895-904, 2016.
- PAPATHANASIOU, S. et al. Tumor necrosis factor-[alpha] confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. **Nature medicine**, New York, v. 21, n. 9, p. 1076-1088, 2015.
- PARASURAMAN, S. Toxicological screening. **Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics**, v. 2, n. 2, p. 74-79, 2011.
- PELLEGATTI, Mario. Preclinical in vivo ADME studies in drug development: A critical review. **Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology**, v. 8, n. 2, p. 161-172, 2012. DOI 10.1517/17425255.2012.652084.
- PELLEGRINI, Andrea et al. The role of Toll-like receptors and adaptive immunity in the development of protective or pathological immune response triggered by the *Trypanosoma cruzi* protozoan. **Future microbiology**, v. 6, n. 12, p. 1521-1533, 2011.
- PEREIRA, K. S. et al. Chagas' disease as a foodborne illness. **Journal of Food Protection®**, Ames, v. 72, n. 2, p. 441-446, 2009.
- PEREIRA, I. R. et al. Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological unbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental Chagas' heart disease. **Mediators of inflammation**, New York, 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2014/798078/abs/>>. Acesso em: 12 abr. 2019.
- PEREIRA, P. C. M.; NAVARRO, E. C. Challenges and perspectives of Chagas disease: a review. **Journal of venomous animals and toxins including tropical diseases**, Botucatu, v. 19, n. 1, p. 34-41, 2013.
- PÉREZ, A. R. et al. TNF- α is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental *Trypanosoma cruzi* infection and favors the export of immature cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034360>>. Acesso em: 8 fev. 2019.
- PEREIRA, Miria Gomes et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to manage internal cholesterol levels under nutritional lipid stress conditions. **PloS one**, v. 10, n. 6, 2015.

PÉREZ-ANTÓN, Elena et al. Impact of benznidazole treatment on the functional response of *Trypanosoma cruzi* antigen-specific CD4⁺ CD8⁺ T cells in chronic Chagas disease patients. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 5, p. e0006480, 2018.

PÉREZ-MOLINA, José A.; MOLINA, Israel. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.

PETHERICK, A. Country by country. **Nature**, London, v. 465, p. S10-S11, 2010.

PINAZO, Maria-Jesús et al. Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. **Expert review of anti-infective therapy**, London, v. 12, n. 4, p. 479-496, 2014.

PINHO, R. T. et al. Production of MMP-9 and inflammatory cytokines by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. **Experimental parasitology**, New York, v. 147, p. 72-80, 2014.

PINZI, Luca; RASTELLI, Giulio. Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4331, 2019.

PISSETTI, Cristina Wide et al. Association between the lymphotoxin-alpha gene polymorphism and chagasic cardiopathy. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 33, n. 3, p. 130-135, 2013.

PONCE, N. E. et al. Toll-like receptor-2 and interleukin-6 mediate cardiomyocyte protection from apoptosis during *Trypanosoma cruzi* murine infection. **Medical microbiology and immunology**, Berlin, v. 201, n. 2, p. 145-155, 2012.

PORRÁS, A. I. et al. Target Product Profile (TPP) for Chagas disease point-of-care diagnosis and assessment of response to treatment. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 6, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4456144/pdf/pntd.0003697.pdf>>. Acesso em: 10 mai. 2019.

PORTO-CARREIRO, Isabel et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European journal of cell biology**, v. 79, n. 11, p. 858-869, 2000.

POVEDA, C. et al. Cytokine profiling in Chagas disease: towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (a BENEFIT TRIAL sub-study). **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091154>>. Acesso em: 5 mai. 2019.

QUEZADA, Christian Quijia et al. Advances in nanocarriers as drug delivery systems in chagas disease, 2019. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 6407–6424, 2019. DOI 10.2147/IJN.S206109.

QVARNSTROM, Y. et al. Sensitive and specific detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 6, n. 7, 2012. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0001689>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

RAIES, Arwa B.; BAJIC, Vladimir B. In *in silico* toxicology: computational methods for the prediction of chemical toxicity. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 6, n. 2, p. 147-172, 2016.

RAO, Srinivasa PS et al. Drug discovery for kinetoplastid diseases: future directions. **ACS infectious diseases**, v. 5, n. 2, p. 152-157, 2018.

RASSI-JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p.1388-1402, 2010.

REIGADA, Chantal et al. Repurposing of terconazole as an anti *Trypanosoma cruzi* agent. **Heliyon**, v. 5, n. 6, p. e01947, 2019.

REQUENA-MÉNDEZ, A. et al. Prevalence of Chagas disease in Latin-American migrants living in Europe: a systematic review and meta-analysis. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 2, p. 3540-3554, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003540>>. Acesso em: 17 out. 2019.

REZENDE-OLIVEIRA, K.; SARMENTO, R. R.; RODRIGUES, V. J. Production of cytokine and chemokines by human mononuclear cells and whole blood cells after infection with *Trypanosoma cruzi*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 1, p. 45-50, 2012.

RIVERO, Cynthia V.; ROMANO, Patricia Silvia. Drugs for the etiologic treatment of Chagas disease: Myths and Truths. In: **International Cardiovascular Forum Journal**. 2016.

ROBERTSON, Lucy J. et al. *Trypanosoma cruzi*: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 6, p. 3–8, 2016. DOI 10.1371/journal.pntd.0004656.

ROCHA, Gerd B. et al. Rm1: A reparameterization of am1 for h, c, n, o, p, s, f, cl, br, and i. **Journal of computational chemistry**, v. 27, n. 10, p. 1101-1111, 2006.

RODRIGUES, C. I. M. et al. Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 10, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000846>>. Acesso em: 7 mai. 2019.

RODRIGUES, D. B. R. et al. *In situ* expression of regulatory cytokines by heart inflammatory cells in Chagas' disease patients with heart failure. **Clinical and Developmental Immunology**, Abingdon, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jir/2012/361730/>>. Acesso em: 16 abr. 2019.

RODRIGUES, Mauricio M.; OLIVEIRA, Ana Carolina; BELLIO, Maria. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development. **Journal of Parasitology Research**, v. 2012, 2012.

RODRIGUES, Vasco et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 2, 2014.

RODRIGUEZ, Juan Bautista. WC-9 a Lead drug with great prospects for American Trypanosomiasis and Toxoplasmosis. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 16, n. 15, p. 1195-1200, 2016.

ROMANHA, A. J. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon- γ in mediating parasitologic cure. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002.

ROMANHA, A. J. et al. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 2, p. 233-238, mar. 2010.

ROPERT, Catherine; GAZZINELLI, Ricardo T. Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 4, p. 395-403, 2000.

RUBIN-DE-CELIS, S. S. C. et al. Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 1888-1898, 2006.

RUBIN-DE-CELIS, S. S. C.; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1522-1530, 2012.

SAN FRANCISCO, J. et al. Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. **Microbes and Infection**, Paris, v. 19, n. 1, p. 55-61, 2017.

SANNER, M. F. et al. Python: a programming language for software integration and development. **J Mol Graph Model**, v. 17, n. 1, p. 57-61, 1999.

SALES-JÚNIOR, P. A. et al. Experimental and Clinical Treatment of Chagas Disease: A Review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

SALOMÃO, Kelly; DE CASTRO, Solange Lisboa. Recent advances in drug development for Chagas disease: two magic words, combination and repositioning. In: **Different Aspects on Chemotherapy of Trypanosomatids**. Nova Science Publishers New York, 2017. p. 181-226.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, Fernando J. et al. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **Elife**, v. 7, p. e34039, 2018.

SANDES, Jana M. et al. *Trypanosoma cruzi* cell death induced by the Morita-Baylis-Hillman adduct 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile). **PLoS One**, v. 9, n. 4, p. e93936, 2014.

SANMARTINO, Mariana et al. The multidimensional comprehension of Chagas disease. Contributions, approaches, challenges and opportunities from and beyond the

Information, Education and Communication field. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 116, p. e200460, 2021.

SANT, D. G. et al. Fungal cell membrane—promising drug target for antifungal therapy. **Journal of applied microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1498-1510, 2016.

SANTANA, Rosa Amélia G. et al. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 1, p. 132, 2019.

SANT'ANNA, C. et al. All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. **Histochemistry and cell biology**, Berlim, v. 130, n. 6, p. 1187-1198, 2008.

SANT'ANNA, C. et al. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, Weinheim, v. 9, n. 7, p. 1782-1794, 2009.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Benznidazole Treatment during Early-indeterminate Chagas' Disease Shifted the Cytokine Expression by Innate and Adaptive Immunity Cells toward a Type 1-modulated Immune Profile. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 64, n. 5, p. 554-563, 2006.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. **Microbes and Infection**, Paris, v. 10, n. 2, p. 103-113, 2008.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Blood leukocytes from benznidazole-treated indeterminate chagas disease patients display an overall type-1-modulated cytokine profile upon short-term in vitro stimulation with *Trypanosoma cruzi* antigens. **BMC infectious diseases**, London, v. 12, n. 1, p. 123, 2012.

SCARIM, Cauê Benito et al. Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 824–838, 2018. DOI 10.1016/j.ejmech.2018.06.040.

SCARIM, Cauê B.; CHIN, Chung M. Current Approaches to Drug Discovery for Chagas Disease: Methodological Advances (a). **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, v. 22, n. 8, p. 509-520, 2019.

SCARIM, Cauê Benito et al. Thiazole, thio and semicarbazone derivatives against tropical infective diseases: Chagas disease, human African trypanosomiasis (HAT), leishmaniasis, and malaria (b). **European journal of medicinal chemistry**, v. 162, p. 378-395, 2019.

SERAFIM, Ricardo Augusto Massarico et al. Nitric oxide: state of the art in drug design. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 3, p. 386-405, 2012.

SHRIVASTAVA, Rahul et al. In *silico* interaction of methyl isocyanate with immune protein responsible for Mycobacterium tuberculosis infection using molecular docking. **Toxicology and industrial health**, v. 32, n. 1, p. 162-167, 2016.

SILVA, J. S.; MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A. The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. **Frontiers in Bioscience**, Tampa, v. 8, p. s314-325, 2003.

SMIRLIS, D. et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 107, 2010.

SOARES, Maurílio José; DE SOUZA, Wanderley. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology research*, v. 77, n. 6, p. 461-468, 1991.

SOARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 4, p. 547-559, 2001.

SOARES, M. B. P. et al. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. **The American journal of pathology**, New York, v. 159, n. 2, p. 703-709, 2001.

SOARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 4, 2001.

SOLDATOW, Valerie Y. et al. In vitro models for liver toxicity testing. **Toxicology research**, v. 2, n. 1, p. 23-39, 2013.

SOSA-ESTANI, S.; COLANTONIO, L.; SEGURA, E. L. Therapy of Chagas disease: implications for levels of prevention. **Journal of tropical medicine**, London, 2012. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/jtm/2012/292138/>>. Acesso em 9 mai. 2019.

SOUSA, S. F. et al. Virtual screening in drug design and development. **Combinatorial chemistry & high throughput screening**, Hilversum, v. 13, n. 5, p. 442-453, 2010.

SOUSA, G. R. et al. Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 3, 2014. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0087082>>. Acesso em: 28 mai. 2019.

SOUSA, G. R. et al. The role of interleukin 17-mediated immune response in Chagas disease: High level is correlated with better left ventricular function. **PloS one**, v. 12, n. 3, 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172833>>. Acesso em: 10 jan. 2022.

SOUZA, Wanderley de. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

SOUZA, Wanderley de. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 89-100, 2009.

SOUZA, P. E. A. et al. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. **Infection and immunity**, Washington, v. 72, n. 9, p. 5283-5291, 2004.

SOUZA, P. E. A. et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 4, p. 1886-1894, 2007.

SOUZA, W.; ATTÍAS, M.; RODRIGUES, J. C. F. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **The international journal of biochemistry & cell biology**, Oxford, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, 2009.

SOUZA-LIMA, R. C. de et al. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 46, n. 4, p. 510-514, 2013.

SOUZA, Viviane do Carmo Gonçalves et al. Evaluation of P2X7 receptor expression in peripheral lymphocytes and immune profile from patients with indeterminate form of Chagas disease. **Microbial pathogenesis**, v. 104, p. 32-38, 2017.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?. **Parasitology today**, Cambridge, v. 15, n. 3, p. 94-99, 1999.

TARLETON, R. L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **International journal for parasitology**, New York, v. 31, n. 5, p. 550-554, 2001.

TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi* and Chagas disease: cause and effect. In: **American trypanosomiasis**. Springer, Boston, MA, 2003. p. 107-115.

TATAKIHARA, V. L. H. et al. Nitric oxide-releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia. **Chemico-biological interactions**, Amsterdam, v. 227, p. 104-111, 2015.

TEIXEIRA, E. D et al^a. **Atlas didático: Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi***. 1. ed. Rio de Janeiro: **Fundação CIERJ: Consórcio CEDERJ**, 2011. p. 1-50.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.

TEIXEIRA, A. R. L. et al^b. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 3, p. 592-630, 2011.

TEMPORAL, R. M. et al. Amidine derivatives and *Leishmania amazonensis*: An evaluation of the effect of nitric oxide (NO) production on the parasite-macrophage interaction. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 1, p. 13-18, 2005. DOI 10.1080/14756360400015207.

TIBAYRENC, M. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid Biology and Disease**, London, v. 2, n. 1, p. 12, 2003.

TORGERSON, Paul R. et al. World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 11 Foodborne Parasitic Diseases, 2010: A Data Synthesis. **PLoS Medicine**, v. 12, n. 12, p. 1–22, 2015. DOI 10.1371/journal.pmed.1001920.

TORRICO, Faustino et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 419-430, 2018.

TORZEWSKI, M. et al. Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon γ –overexpressing transgenic mice Is mediated by tumor necrosis factor- α . **The American journal of pathology**, New York, v. 180, n. 1, p. 73-81, 2012.

TOSO, A.; VIAL, F.; GALANTI, N. Transmisión de la enfermedad de Chagas por vía oral. **Revista Médica de Chile**, Santiago, v. 139, n. 2, p. 258-266, 2011.

TROTT, Oleg; OLSON, Arthur J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455-461, 2010.

VARGAS, Alexander et al. Investigação de surto de doença de Chagas aguda na região extra-amazônica, Rio Grande do Norte, Brasil, 2016. **Cadernos de saúde pública**, v. 34, p. e00006517, 2018.

VÁZQUEZ, Karina et al. Trypanothione reductase: a target for the development of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 17, n. 11, p. 939-946, 2017.

VERMELHO, Alane Beatriz; RODRIGUES, Giseli Capaci; SUPURAN, Claudiu T. Why hasn't there been more progress in new Chagas disease drug discovery?. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 15, n. 2, p. 145-158, 2020.

VILLALTA, Fernando; RACHAKONDA, Girish. Advances in preclinical approaches to Chagas disease drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, v. 14, n. 11, p. 1161-1174, 2019.

VILLANI, F. N. A. et al. *Trypanosoma cruzi*-Induced Activation of Functionally Distinct $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD4– CD8– T Cells in Individuals with Polar Forms of Chagas' Disease. **Infection and immunity**, Washington, v. 78, n. 10, p. 4421-4430, 2010.

VIOTTI, R. et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 58, n. 2, p. 635-639, 2014.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Chagasic patients with indeterminate clinical form of the disease have high frequencies of circulating CD3+ CD16–CD56+ natural killer T cells and CD4+ CD25 High regulatory T lymphocytes. **Scandinavian journal of immunology**, Oslo, v. 62, n. 3, p. 297-308, 2005.

UPADHYAY, Ravi Kant. Drug delivery systems, CNS protection, and the blood brain barrier. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014. DOI 10.1155/2014/869269.

URBINA, Julio A. et al. Squalene synthase as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 125, n. 1-2, p. 35-45, 2002.

URBINA, Julio A. et al. Mechanism of action of 4-phenoxyphenoxyethyl thiocyanate (WC-9) against *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 2047-2050, 2003.

URBINA, J. A. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, Cincinnati, v. 62, n. 1, p. 149-156, 2015.

URLACHER, Vlada B.; GIRHARD, M. Cytochrome P450 Monooxygenases in Biotechnology and Synthetic Biology. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 8, p. 882-897, 2019. DOI 10.1016/j.tibtech.2019.01.001. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2019.01.001>.

VEBER, Daniel F. et al. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 12, p. 2615-2623, 2002.

WARING, Michael J. et al. An analysis of the attrition of drug candidates from four major pharmaceutical companies. **Nature reviews Drug discovery**, v. 14, n. 7, p. 475-486, 2015.

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

YOUDIM, Moussa B.H.; EDMONDSON, Dale; TIPTON, Keith F. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 295-309, 2006. DOI 10.1038/nrn1883.

YOUDIM, Moussa BH. Monoamine oxidase inhibitors, and iron chelators in depressive illness and neurodegenerative diseases. **Journal of Neural Transmission**, v. 125, n. 11, p. 1719-1733, 2018.

ZELEDON, Rodrigo et al. An appraisal of the status of Chagas disease in the United States. **Elsevier**, 2012.

ZINGALES, Bianca. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38-52, 2018.

APÊNDICE A – ARTIGO PUBLICADO (*FRONTIERS IN PHARMACOLOGY*)

Chagas Disease Treatment and Rational Drug Discovery: A Challenge That Remains

Ana Catarina Cristovão-Silva^{1,4*}, Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro^{1,2},
Ana Cristina Lima Leite³, Valéria Rêgo Alves Pereira¹ and Marcelo Zaldini Hernandez³

¹Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Recife, Brazil, ²Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil, ³Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ⁴Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Biotecnologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Keywords: Chagas disease, drug development, drug target, *Trypanosoma cruzi*, benznidazole

OPEN ACCESS

Edited by:

Mauro Martins Teixeira,
Federal University of Minas Gerais,
Brazil

Reviewed by:

Frederick S Buckner,
University of Washington,
United States

*Correspondence:

Ana Catarina Cristovão Silva
cristovao@outlook.com

Specialty section:

This article was submitted to
Experimental Pharmacology and
Drug Discovery,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 17 April 2019

Accepted: 08 July 2019

Published: 02 August 2019

Citation:

Silva ACC, Brelaz-de-Castro MCA,
Leite ACL, Pereira VRA and
Hernandez MZ (2019) Chagas
Disease Treatment and Rational Drug
Discovery: A Challenge That Remains.
Front. Pharmacol. 10:873.
doi: 10.3389/fphar.2019.00873

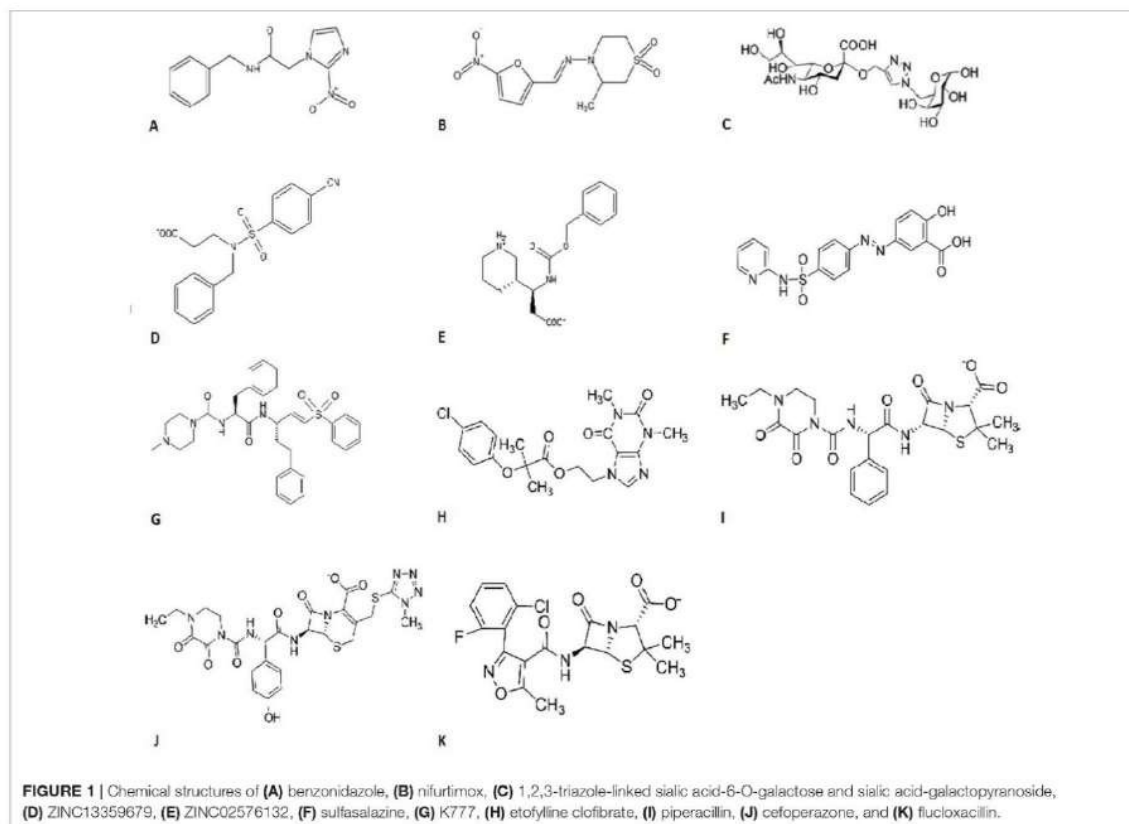
Chagas disease is a neglected disease caused by *Trypanosoma cruzi*, a protozoan of the family Trypanosomatidae. Chagas disease is an important public health issue, affecting mainly populations who have lower socioeconomic resources and less access to health. Estimates suggest that 6 to 7 million people worldwide have the disease and that it is predominantly distributed among the 21 countries of Latin America, where more than 1 million of those cases occur in Brazil (WHO, 2015).

Since its discovery in 1909, several compounds have been tested as candidates for its treatment, such as arsenic, fuchsin, bismuth, antihistamines, amphotericin B, antibiotics, and others (Coura and De Castro, 2002). Currently, the treatment is based on the administration of two drugs: benznidazole (Figure 1A) or nifurtimox (Figure 1B). These drugs are more effective in the acute phase over the chronic phase and have a high toxicity rate (Morilla and Romero, 2015).

According to the Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2016), the adverse effects caused by the treatment's great toxicity are mainly gastrointestinal, including vomiting, abdominal pain, anorexia, and weight loss regarding nifurtimox and allergic dermatitis, insomnia, and peripheral neuropathy as related to benznidazole. Since the discovery of these two compounds, no other drug has been approved for Chagas disease treatment in the last 40 years (Bellera et al., 2015). The treatment is indicated for all individuals with acute infection, cases of congenital infection, immunosuppressed patients, and children with the chronic form of the disease (CDC, 2016).

According to the Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi, 2015), the current treatment presents issues, such as long-term treatment (30–60 days), dose-dependent toxicity, low adherence rate, and lack of a pediatric formulation. In 2011, a formulation to be used in children under 2 years old produced by the Pharmaceutical Laboratory of Pernambuco (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco or LAFEPE) and registered by the National Sanitary Surveillance Agency of Brazil (Agência Nacional de Vigilância Sanitária or ANVISA) was launched with the support of DNDi. Some of the advantages linked to this formulation are as follows: there is more safety for this age group; it is a tablet readily dispersible in liquids, which facilitates administration; the need for fractionation is only required in special cases (premature infants weighing less than 2.5 kg); and the drug can be safely administered at home throughout the treatment (twice a day for 60 days).

The poor access to medication is another issue related to Chagas disease treatment. Some countries in non-endemic area, such as Spain, have reported the shortage of the drug (Navarro et al., 2012). The shortage was mainly due to the increased demand of the drug that was not being followed by its production (Chaar, 2014). This demonstrates the need of a management plan for Chagas disease treatment, which still remains in a state of neglect.



Besides that, clinical studies with new candidates for Chagas disease treatment requires great time and effort, and diagnosis limitations such as the lack of tools that can demonstrate parasitological cure in the chronic phase have not yet been overcome (Urbina, 2015). The lack of consensus regarding the efficacy of the chronic disease treatment has also been reported both in experimental models and in studies with chronic patients (Marin-Neto et al., 2009). In 2015, a multicenter randomized study with chronic chagasic patients was conducted by researchers in Brazil, Colombia, El Salvador, Argentina, and Bolivia. The study, Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis, has evaluated the efficacy of benznidazole in preventing the progression to chronic chagasic cardiopathy and death of patients by following 2,854 individuals for 5 years. Although progress has been made regarding the understanding of effect of benznidazole during treatment, no reduction of heart disease was observed in treated patients (Morillo et al., 2015).

Another clinical trial with Chagas disease patients is the Benznidazole New Doses Improved Treatment & Therapeutic Associations study (DNDi, 2019). The aim of this trial was to find new dosages of the current treatment without decreasing its effectiveness, whereas a combined treatment with fosravuconazole, a broad-spectrum antifungal drug, was

also tested. They found that the 2-week treatment is promising as it is four times shorter than the standard treatment, and all patients completed the course. This lower dosage and time of treatment would facilitate treatment adherence, as it would consequently reduce adverse effects. The data of the combination arm (benznidazole combined with fosravuconazole) is still being analyzed.

CHALLENGES IN THE STUDY OF EFFECTIVE DRUGS FOR CHAGAS DISEASE

One of the main focuses on Chagas disease research has been the development of an effective control strategy (Bonney, 2014). However, there are some obstacles when considering the development of effective compounds, such as the difficulty of standardizing *in vivo* and *in vitro* tests for their screening and the absence of markers of treatment efficacy and cure criteria for the disease (Romanha et al., 2010; Pinazo et al., 2014). To evaluate the cure criteria, polymerase chain reaction and serologic conversion are used to assess parasite load (Viotti et al., 2014; Torrico et al., 2018). However, serologic conversion may take years to be achieved, so new sensitive markers

of efficacy are required (Gonçalves and Novaes, 2018). There are a number of questions that can only be answered by improving experimental research on drugs for Chagas disease, including better *in vivo* models of the disease and knowing what would be the cure criteria for these models (Chatelain and Konar, 2015).

Regarding the treatment, DNDi has indicated some criteria that are considered acceptable and ideal for Chagas disease as follows: to be active against all strains of *T. cruzi*, the clinical efficacy has to be superior to benznidazole in all phases of the disease, it must not have contraindications or pharmacologic interactions, and it has to be administered orally (DNDi, 2016).

Therefore, difficulties do exist and there is a need to overcome them to discover a suitable treatment for the disease.

SYNTHETIC DRUGS AND NEW THERAPEUTIC APPROACHES FOR CHAGAS DISEASE

The search for new drugs against Chagas disease has evolved appreciably in recent years (Buckner and Navabi, 2010). In this context, different strategies of drug design and discovery are used and have proven to be effective, such as molecular simplification, privileged structures use, prodrugs, quantitative structure-activity relationship (QSAR), and molecular docking. Molecular simplification is applied when there is a need to reduce the complexity of a target compound. It is a strategy widely used with natural compounds and derivatives (Wang et al., 2019). A study with indole-pyrimidine derivatives achieved by molecular simplification found two of these derivatives that had great potential as candidates for the lead optimization of a new treatment for Chagas disease (Braga et al., 2017). The use of privileged structures that can accept ligands to multiple receptors is another strategy used to find new treatment for neglected diseases, including Chagas disease. Some of these promising structures are thiosemicarbazones and thiazolidinones (Leite et al., 2017). The prodrugs, which are compounds that need to be biotransformed to show its pharmacologic activity, are used to improve pharmacologic (solubility, chemical stability), pharmacokinetic (absorption, metabolism), and pharmacodynamic (decrease toxicity, activation to a reactive agent) features (Abet et al., 2017). A study with three oral E1224 (a water-soluble ravuconazole prodrug) regimens and benznidazole in subjects with chronic indeterminate Chagas disease suggested the use of E1224 in combination with benznidazole (Torricco et al., 2018). QSAR and molecular docking are very useful computational tools to predict the activity of compounds (Ferreira et al., 2015). Both strategies were done to predict the activity of a series of benzimidazole derivatives in which QSAR models conducted the design of these derivatives with improved potency (Pauli et al., 2017).

For studies to progress, different approaches such as rational design and discovery and drug repurposing are done. Some strategies of the aforementioned approach were described above. Drug repurposing relies on finding new uses for marketed therapeutics or substantially characterized investigational compounds (Langedijk et al., 2015). Repurposing programs have mainly relied on bioinformatics and structure-based approaches

aside from target phenotypic screens using whole-cell assays (Ferreira and Andricopulo, 2016). Some repositioned drugs that reached clinical trial studies for Chagas disease are the antifungals fexinidazole and posaconazole (Molina et al., 2014; DNDi, 2019).

Drug discovery based on target is the main focus of this revision, which is the rational drug discovery that relies in the search of specific molecular targets of the parasite, most of them being enzymes, and design compounds that can modulate them (Gilbert, 2013; Field et al., 2017). Thus, several molecules have been explored in medicinal chemistry programs applying drug planning methods based on receptor and ligand structures (Dias et al., 2009). Some important *T. cruzi* enzymatic targets such as trans-sialidase, nitroreductase type I (NTR), and cruzain were investigated and selected in this review as they are some of the most searched targets for Chagas disease (Miller III and Roitberg, 2013a; Balaña-Fouce et al., 2014; Bermudez et al., 2016; San Francisco et al., 2017; Scarim et al., 2018).

Trans-sialidase is an enzyme that is absent in mammalian cells and is involved in parasite evasion from the immune system, more specifically from the complement system, as well as in adhesion and invasion onto host cells, decrease of T and B lymphocytes, and thymic atrophy (Rubin-de-Celis et al., 2006; Rubin-de-Celis and Schenkman, 2012; Nardy et al., 2016). The sialylmimetic neoglycoconjugates were investigated, where 1,2,3-triazole-linked sialic acid-6-O-galactose and sialic acid-galactopyranoside compound (Figure 1C) stood out regarding their anti-enzyme activities (Campo et al., 2012). The conjugation of lactitol analogues with polyethylene glycol has also been shown to be effective in inhibiting this enzyme during *in vitro* studies (Giorgi et al., 2012). More recently, a database screening of more than 4 million compounds has found two molecules, ZINC13359679 (Figure 1D) and ZINC02576132 (Figure 1E), as the most promising candidates that could inhibit this enzyme (Miller III and Roitberg, 2013b). When computational strategies screened more than 3000 drugs approved by the Food and Drug Administration (FDA), and *in vitro* and *in vivo* tests were performed, it was seen that the anti-inflammatory sulfasalazine (Figure 1F) can be used as a lead to design new enzyme inhibitor drugs (Lara-Ramirez et al., 2017). Recently, it was found that molecules containing amide, hydroxyl, and carboxylic acid radicals in their aromatic rings can enhance the biological activity of these enzyme inhibitors, which may lead to a better rational drug design (Kashif et al., 2017).

NTR is an enzyme involved in the activation of nitroheterocyclic compounds, such as benznidazole and nifurtimox (Wilkinson et al., 2008). Recent studies have shown its *in vitro* and *in vivo* potential in studies of absorption, distribution, metabolism, and excretion of this enzyme inhibitors (Papadopoulou et al., 2013; Papadopoulou et al., 2015; Papadopoulou et al., 2016). Corroborating this idea, a study demonstrated that NTR inhibitors were more effective than inhibitors of ergosterol synthesis when tests using amastigotes from representatives of each discrete type unit (DTU) were performed (Moraes et al., 2014). DTU is a set of genetically similar *T. cruzi* populations that can be identified by common genetic, molecular, and immunologic markers (Tibayrenc, 2003). In this way, different DTUs can present diverse response toward the compounds and this strengthens the use of this approach.

Cruzain, also called cruzipain or GP57/51, is the most abundant protein in the *T. cruzi* cysteine protease family, being the key enzyme for the parasite's intracellular replication (Alvarez et al., 2012) and in its escape from the host's immune system, representing a molecular target to design new antiparasitic drugs (Harth et al., 1993; McKerrow et al., 1999; Siles et al., 2006). In vitro tests performed by our research group with thiazide derivatives aryl thiosemicarbazones and aryl-4-thiazolinones showed that they had an effective anti-*T. cruzi* activity (Donnici et al., 2009) even on a nanomolar scale as confirmed by the high affinity of these molecules for cruzain during docking studies. The most potent and well-known inhibitor of this enzyme is K777 (Figure 1G), which is about to enter clinical studies (McKerrow et al., 2009; Duschak, 2016). In the same way as for trans-sialidase, a screening with drugs that were approved by the FDA was conducted for cruzain and found that four compounds could be used as a basis to design new drugs, namely etofylline clofibrate (antilipemic, Figure 1H) and piperacillin, cefoperazone, and flucloxacillin (antibiotics, Figures 1I–K, respectively) (Palos et al., 2017).

CONCLUSION AND PERSPECTIVES

Different strategies are applied in view to find an alternative treatment for Chagas disease, including drug repositioning

and target-based drug design. Opportunities for drug planning studies are promising, especially with the recent advances in molecular and cell biology, medicinal and computational chemistry, and planned organic synthesis. For a thorough and correct election of a drug candidate against Chagas disease, further activity studies within preclinical trials (such as in vivo testing) and clinical trials are needed. However, there is still a large gap regarding the standardization of these tests as well as a lack of biomarkers and cure criteria. With the combination of different techniques and strategies to discover new drugs, we hope that a refinement in search for a new therapy against Chagas disease will be facilitated, leading to the achievement of this important goal.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ACC-S and MCAB-C wrote the manuscript. VRAP, ACCL, and MZH contributed to the discussion of the draft and made final corrections.

FUNDING

ACC-S is the recipient of a Ph.D. fellowship from CAPES.

REFERENCES

- Abet, V., Filace, F., Recio, J., Alvarez-Builla, J., and Burgos, C. (2017). Prodrug approach: an overview of recent cases. *Eur. J. Med. Chem.* 127, 810–827. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.10.061
- Alvarez, V. E., Niemrowicz, G. T., and Cazzulo, J. J. (2012). The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. *BBA-Proteins Proteom.* 1824 (1), 195–206. doi: 10.1016/j.bbapap.2011.05.011
- Balana-Fouce, R., Alvarez-Velilla, R., Fernández-Prada, C., García-Estrada, C., and Reguera, R. M. (2014). Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4 (3), 326–337. doi: 10.1016/j.ijddr.2014.07.006
- Bellera, C. L., Balcazar, D. E., Vazrell, M. C., Casassa, A. E., Palestro, P. H., Gavernet, L., et al. (2015). Computer-guided drug repurposing: identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. *Eur. J. Med. Chem.* 93, 338–348. doi: 10.1016/j.ejmech.2015.01.065
- Bermudez, I., Davies, C., Simonazzi, A., Real, J. P., and Palma, S. (2016). Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop.* 156, 1–16. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017
- Bonney, K. M. (2014). Chagas disease in the 21st century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 21, 1–10. doi: 10.1051/parasite/2014012
- Braga, S. F. P., Martins, I. C., da Silva, E. B., Júnior, P. A. S., Murta, S. M. F., Romanha, A. J., et al. (2017). Synthesis and biological evaluation of potential inhibitors of the cysteine proteases cruzain and rhodesain designed by molecular simplification. *Bioorg. Med. Chem.* 25 (6), 1889–1900. doi: 10.1016/j.bmc.2017.02.009
- Buckner, F. S., and Navabi, N. (2010). Advances in Chagas disease drug development: 2009–2010. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 23 (6), 609. doi: 10.1097/QCO.0b013e3283402956
- Campo, V. L., Sesti-Costa, R., Carneiro, Z. A., Silva, J. S., Schenkman, S., and Carvalho, I. (2012). Design, synthesis and the effect of 1,2,3-triazole sialylmimetic neoglycoconjugates on *Trypanosoma cruzi* and its cell surface trans-sialidase. *Bioorg. Med. Chem.* 20 (1), 145–156. doi: 10.1016/j.bmc.2011.11.022
- CDC. (2016). Available at: https://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html (accessed April 10, 2019).
- CDC. (2016). Available at: <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/treatment.html> (accessed April 10, 2019).
- Chaar, R. B. (2014). Medicine shortages: implications for the Australian healthcare system. *Australas. Med. J.* 7 (3), 161. doi: 10.4066/AMJ.2014.1943
- Chatelain, E., and Konar, N. (2015). Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Des. Dev. Ther.* 9, 4807. doi: 10.2147/DDDT.S90208
- Coura, J. R., and De Castro, S. L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 97 (1), 3–24. doi: 10.1590/S0074-02762002000100001
- Dias, L. C., Dessoy, M. A., Silva, J. J. N., Thiemann, O. H., Oliva, G., and Andricopulo, A. D. (2009). Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Quim. Nova* 32 (9), 2444–2457. doi: 10.1590/S0100-40422009000900038
- DNDi. (2015). Available at: <https://www.dndi.org/doencas/doenca-chagas/tratamentos-atuais/> (accessed April 10, 2019).
- DNDi. (2016). Available at: <http://www.dndi.org/diseases/projects/chagas/chagas-target-product-profile/> (accessed April 10, 2019).
- DNDi. (2019). Available at: https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2019/03/2page_BenditStudyOverview_ENG.pdf (accessed April 10, 2019).
- Donnici, C. L., Araújo, M. H., Oliveira, H. S., Moreira, D. R. M., Pereira, V. R. A., de Assis Souza, M., et al. (2009). Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: synthesis, biological characterization and structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem.* 17 (14), 5038–5043. doi: 10.1016/j.bmc.2009.05.071
- Duschak, V. G. (2016). Targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease in the last 15 years-period. *Recent Pat. Antinfect. Drug Discov.* 11 (2), 74–173. doi: 10.2174/1574891X11666161024165304
- Ferreira, L. G., and Andricopulo, A. D. (2016). Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective. *Drug Discov. Today* 21 (10), 1699–1710. doi: 10.1016/j.drudis.2016.06.021

- Ferreira, L., dos Santos, R., Oliva, G., and Andricopulo, A. (2015). Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules* 20 (7), 13384–13421. doi: 10.3390/molecules200713384
- Field, M. C., Horn, D., Fairlamb, A. H., Ferguson, M. A., Gray, D. W., Read, K. D., et al. (2017). Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (4), 217. doi: 10.1038/nrmicro.2016.193
- Gilbert, I. H. (2013). Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches: miniperspectives series on phenotypic screening for anti-infective targets. *J. Med. Chem.* 56 (20), 7719–7726. doi: 10.1021/jm400362b
- Giorgi, M. E., Ratier, L., Agusti, R., Frasch, A. C., and de Lederkremer, R. M. (2012). Improved bioavailability of inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase: PEGylation of lactose analogs with multiarm polyethyleneglycol. *Glycobiology* 22 (10), 1363–1373. doi: 10.1093/glycob/cws091
- Gonçalves, R. V., and Novaes, R. D. (2018). Chronic Chagas disease: therapeutic protocols and efficacy endpoints. *Lancet Infect. Dis.* 18 (7), 719–720. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30342-6
- Harth, G., Andrews, N., Mills, A. A., Engel, J. C., Smith, R., and McKerrow, J. H. (1993). Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Molecul. Biochem. Parasitol.* 58 (1), 17–24. doi: 10.1016/0166-6851(93)90086-D
- Kashif, M., Moreno-Herrera, A., Villalobos-Rocha, J. C., Nogueira-Torres, B., Pérez-Villanueva, J., Rodríguez-Villar, K., et al. (2017). Benzoic acid derivatives with trypanocidal activity: enzymatic analysis and molecular docking studies toward trans-sialidase. *Molecules* 22 (11), 1863. doi: 10.3390/molecules22111863
- Langedijk, J., Mantel-Teeuwisse, A. K., Slijkerman, D. S., and Schutjens, M. H. D. (2015). Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature. *Drug Discov. Today* 20 (8), 1027–1034. doi: 10.1016/j.drudis.2015.05.001
- Lara-Ramirez, E. E., López-Cedillo, J. C., Nogueira-Torres, B., Kashif, M., Garcia-Perez, C., Bocanegra-Garcia, V., et al. (2017). An *in vitro* and *in vivo* evaluation of new potential trans-sialidase inhibitors of *Trypanosoma cruzi* predicted by a computational drug repositioning method. *Eur. J. Med. Chem.* 132, 249–261. doi: 10.1016/j.ejmech.2017.03.063
- Leite, A. L., Espindola, J. W. P., Cardoso, M. V. O., and Oliveira-Filho, G. V. (2017). Privileged structures in the design of potential drug candidates for neglected diseases. *Curr. Med. Chem.* 25, 1–30. doi: 10.2174/0929867324666171023163752
- Marin-Neto, J. A., Rassi, A., Jr., Avezum, A., Jr., Mattos, A. C., and Rassi, A. (2009). The BENEFIT trial: testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 319–324. doi: 10.1590/S0074-02762009000900042
- McKerrow, J. H., Engel, J. C., and Caffrey, C. R. (1999). Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg. Med. Chem.* 7 (4), 639–644. doi: 10.1016/S0968-0896(99)00008-5
- McKerrow, J. H., Doyle, P. S., Engel, J. C., Podust, L. M., Robertson, S. A., Ferreira, R., et al. (2009). Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 263–269. doi: 10.1590/S0074-02762009000900034
- Miller, B. R., III, and Roitberg, A. E. (2013a). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a drug target against Chagas disease (American trypanosomiasis). *Future Med. Chem.* 5 (15), 1889–1900. doi: 10.4155/fmc.13.129
- Miller, B. R., III, and Roitberg, A. E. (2013b). Design of e-pharmacophore models using compound fragments for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*: screening for novel inhibitor scaffolds. *J. Mol. Graph. Model.* 45, 84–97. doi: 10.1016/j.jmgm.2013.08.009
- Moraes, C. B., Giardini, M. A., Kim, H., Franco, C. H., Araujo-Junior, A. M., Schenkman, S., et al. (2014). Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci. Rep.* 4, 4703. doi: 10.1038/srep04703
- Molina, I., Gómez i Prat, J., Salvador, E., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., et al. (2014). Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.* 370 (20), 1899–1908. doi: 10.1056/NEJMoa1313122
- Morilla, M. J., and Romero, E. L. (2015). Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine* 10 (3), 465–481. doi: 10.2217/nnm.14.185
- Morillo, C. A., Marin-Neto, J. A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A., Jr., Rosas, F., et al. (2015). Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N. Engl. J. Med.* 373 (14), 1295–1306. doi: 10.1056/NEJMoa1507574
- Nardy, A. F., Freire-de-Lima, C. G., Pérez, A. R., and Morrot, A. (2016). Role of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on the escape from host immune surveillance. *Front. Microbiol.* 7, 348. doi: 10.3389/fmicb.2016.00348
- Navarro, M., Norman, F. E., Pérez-Molina, J. A., and López-Vélez, R. (2012). Benznidazole shortage makes Chagas disease a neglected tropical disease in developed countries: data from Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 87 (3), 489–490. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0080
- Palos, I., Lara-Ramirez, E. E., Lopez-Cedillo, J. C., Garcia-Perez, C., Kashif, M., Bocanegra-Garcia, V., et al. (2017). Repositioning FDA drugs as potential cruzain inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: virtual screening, *in vitro* and *in vivo* studies. *Molecules* 22 (6), 1015. doi: 10.3390/molecules22061015
- Papadopoulos, M. V., Bloomer, W. D., Rosenzweig, H. S., Ashworth, R., Wilkinson, S. R., Kaiser, M., et al. (2013). Novel 3-nitro-1 H-1,2,4-triazole-based compounds as potential anti-Chagasic drugs: *in vivo* studies. *Future Med. Chem.* 5 (15), 1763–1776. doi: 10.4155/fmc.13.108
- Papadopoulos, M. V., Bloomer, W. D., Lepesheva, G. I., Rosenzweig, H. S., Kaiser, M., Aguilera-Venegas, B., et al. (2015). Novel 3-nitrotriazole-based amides and carbinols as bifunctional antichagasic agents. *J. Med. Chem.* 58 (3), 1307–1319. doi: 10.1021/jm5015742
- Papadopoulos, M. V., Bloomer, W. D., Rosenzweig, H. S., Wilkinson, S. R., Szular, J., and Kaiser, M. (2016). Nitrotriazole-based acetamides and propanamides with broad spectrum antitrypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* 123, 895–904. doi: 10.1016/j.ejmech.2016.08.002
- Pauli, I., Ferreira, L. G., de Souza, M. L., Oliva, G., Ferreira, R. S., Dessoy, M. A., et al. (2017). Molecular modeling and structure-activity relationships for a series of benzimidazole derivatives as cruzain inhibitors. *Future Med. Chem.* 9 (7), 641–657. doi: 10.4155/fmc-2016-0236
- Pinazo, M. J., Thomas, M. C., Bua, J., Perrone, A., Schijman, A. G., Viotti, R. J., et al. (2014). Biological markers for evaluating therapeutic efficacy in Chagas disease, a systematic review. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12 (4), 479–496. doi: 10.1586/14787210.2014.899150
- Romanha, A. J., Castro, S. L. D., Socio, M. D. N. C., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., et al. (2010). *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105 (2), 233–238. doi: 10.1590/S0074-02762010000200022
- Rubin-de-Celis, S. S., and Schenkman, S. (2012). *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. *Cell. Microbiol.* 14 (10), 1522–1530. doi: 10.1111/j.1462-5822.2012.01831.x
- Rubin-de-Celis, S. S., Uemura, H., Yoshida, N., and Schenkman, S. (2006). Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* increases parasite escape from its parasitophorous vacuole. *Cell. Microbiol.* 8 (12), 1888–1898. doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00755.x
- San Francisco, J., Barria, I., Gutiérrez, B., Neira, I., Munoz, C., Sagua, H., et al. (2017). Decreased cruzipain and gp85/trans-sialidase family protein expression contributes to loss of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote virulence. *Microbes Infect.* 19 (1), 55–61. doi: 10.1016/j.micinf.2016.08.003
- Scarim, C. B., Jornada, D. H., Chelucci, R. C., de Almeida, L., dos Santos, J. L., and Chin, C. M. (2018). Current advances in drug discovery for Chagas disease. *Eur. J. Med. Chem.* 155, 824–838. doi: 10.1016/j.ejmech.2018.06.040
- Siles, R., Chen, S. E., Zhou, M., Pinney, K. G., and Trawick, M. L. (2006). Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (16), 4405–4409. doi: 10.1016/j.bmcl.2006.05.041
- Tibayrenc, M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (discrete typing units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol. Dis.* 2 (1), 12. doi: 10.1186/1475-9292-2-12
- Torrico, F., Gascon, J., Ortiz, L., Alonso-Vega, C., Pinazo, M. J., Schijman, A., et al. (2018). Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.* 18 (4), 419–430. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30538-8

- Urbina, J. A. (2015). Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic Chagas disease: advances, challenges and perspectives. *J. Eukaryot. Microbiol.* 62 (1), 149–156. doi: 10.1111/jeu.12184
- Viotti, R., De Noya, B. A., Araujo-Jorge, T., Grijalva, M. J., Guhl, F., López, M. C., et al. (2014). Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58 (2), 635–639. doi: 10.1128/AAC.01662-13
- Wang, S., Dong, G., and Sheng, C. (2019). Structural simplification of natural products. *Chem. Rev.* 119 (6), 4180–4220. doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00504
- WHO. (2015). Available at: <http://www.who.int/wer/2015/en> (accessed April 10, 2019).
- Wilkinson, S. R., Taylor, M. C., Horn, D., Kelly, J. M., and Cheeseman, I. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (13), 5022–5027. doi: 10.1073/pnas.0711014105
- Conflict of Interest Statement:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Silva, Brelaz-de-Castro, Letie, Pereira and Hernandez. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO (CYTOKINE & GROWTH FACTORS REVIEWS)

ARTICLE IN PRESS

Cytokine and Growth Factor Reviews xxx (xxxx) xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Cytokine and Growth Factor Reviews

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cytogfr



Chagas disease: Immunology of the disease at a glance

Ana Catarina Cristovão-Silva^{a,*,1}, Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro^{a,b,c,2,3},
Marcelo Zaldini Hernandez^{a,d,4}, Valéria Régio Alves Pereira^{a,b}

^a Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Centro de Biotecnologias, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brazil

^d Laboratório de Química Teórica e Medicinal, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Immune system
Cytokines
Treatment
Neglected disease
Benzimidazole
Trypanosoma cruzi

ABSTRACT

Chagas disease is an important neglected disease that affects 6–7 million people worldwide. The disease has two phases: acute and chronic, in which there are different clinical symptoms. Controlling the infection depends on innate and acquired immune responses, which are activated during the initial infection and are critical for host survival. Furthermore, the immune system plays an important role in the therapeutic success. Here we summarize the importance of the immune system cytokines in the pathology outcome, as well as in the treatment.

1. Introduction

Chagas disease is an important public health problem because it affects mainly a portion of the population that has lower socioeconomic resources and less access to health care. There are about 6–7 million people worldwide with the disease [1], which is caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* and was discovered in 1909 by the physician Carlos Chagas. Benznidazole (Bz) and nifurtimox (Nx) are the current treatment of the disease, which are effective in the acute stage of the disease, but not in the chronic stage [2]. Furthermore, these drugs have a high toxicity that leads to different adverse effects. Despite being discovered 111 years ago there is still much to be understood about it [3], especially concerning the host immune response and cytokines. The life cycle of *T. cruzi* begins when the vector — different species of triatomines [4] — makes the blood meal in an infected host. In the vector, the parasite differentiates into epimastigotes. After that, epimastigotes migrate to the hindgut of the vector where they differentiate into metacyclic trypomastigotes (infective form). These forms are eliminated in the urine and feces of the vector during blood meal. In the mammalian host,

trypomastigotes infect cells and later turns into amastigotes (intracellular form). These amastigotes will turn into trypomastigotes, which rupture cells and spread the infection in the host. In the Fig. 1, it is possible to see the vector and the mammalian stages of the parasite.

The disease has two phases: acute and chronic. The acute phase may present in some ways: asymptomatic, symptomatic with nonspecific symptoms (fever, apathy, hepatosplenomegaly, etc.). After this acute phase, about one-third of patients progress to the chronic phase. At this stage, there may be progression to the indeterminate form - without evidence of organic impairment - or to the symptomatic (cardiac, digestive or cardio-digestive), decades after the initial infection [5].

Patients with the indeterminate form have positive serology for anti-*T. cruzi* antibodies, normal electrocardiogram, and normal radiology of the chest, esophagus and colon [6]. Individuals with the digestive form have alterations in the esophagus and colon motility, which can lead to problems of deglutition, regurgitation and constipation [7]. Most patients with the chronic form have the cardiac manifestation, which is extremely debilitating. This disease presentation has as its main histopathological characteristic myocardial inflammation, which can lead to

* Corresponding author.

E-mail addresses: acristovao@outlook.com (A.C. Cristovão-Silva), carolina.brelaz@gmail.com (M.C.A. Brelaz-de-Castro), marcelo.hernandes@ufpe.br (M.Z. Hernandez), valeriaph@gmail.com (V.R.A. Pereira).

¹ Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE 50670-420, Brazil.

² Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil.

³ Postal address: Rua Alto do Reservatório, Alto José Leal, Vitória de Santo Antão, Pernambuco 55608-250, Brazil.

⁴ Postal address: Av. Professor Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco 50740-521, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.001>

Received 10 August 2021; Received in revised form 6 October 2021; Accepted 8 October 2021

Available online 13 October 2021

1359-6101/© 2021 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Please cite this article as: Ana Catarina Cristovão-Silva, *Cytokine and Growth Factor Reviews*, <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.10.001>

enlargement of the heart (megalocardia), together with myocytolysis and fibrosis [8].

There are two antithetic strands of thoughts for chronic chagasic pathogenesis. The first one brings the idea that *T. cruzi* induces a response of the immune system to normal tissues of the host and this is independent of its presence in the tissue, that is, it induces an autoimmunity [9]. The second supports the hypothesis that the continuous presence of the parasite in the tissues is responsible for the inflammation and damage observed [10].

Controlling *T. cruzi* infection depends on innate and acquired immune responses, which are activated during the initial infection and are critical for host. Although there is a conflict about the mechanism of Chagas' disease pathology, the role of the cytokines has been reported in the acute and chronic phases of the disease. Due to the importance of the immune system in the pathogenesis of the disease, it is also important to understand how treatment can influence in disease progression.

2. Immune response in the acute phase

The innate immune response plays an important role in the initial fight against the parasite, and toll-like receptors (TLRs) help to orchestrate this response. Since cells of the innate immune response are directly involved in combating the initial infection with *T. cruzi*, it is interesting to understand the interaction of the parasite compounds with the TLRs in order to stimulate the capacity of this immune response to fight the infection [11]. TLRs are a family of transmembrane proteins, evolutionarily conserved between insects and humans that are part of a group of molecules called pattern recognition receptors (PRRs). When interacting and recognizing molecules called the pathogen-associated molecular pattern (PAMPs) they can induce an immune response, both innate and acquired. Several molecules of the parasite have been identified as PAMPs for TLRs. The main ones are the glycosylphosphatidylinositol-anchors derived from *T. cruzi* mucin-like glycoproteins (GPI-mucins) found in large quantities in the cell membrane of the trypanosomatids. Studies have shown that GPIs derived from trypomastigotes are recognized by TLR2, which is active after the dimerization with TLR6 [12,13]. Another molecule of the parasite, glycoinositolphospholipids (GIPLs) is recognized by TLR4 [12,14,15]. The first confirmation of the importance of TLRs in the mechanisms of resistance to *T. cruzi* was achieved using knockout mice for the adapter molecule MyD88, essential for signaling to almost all TLRs. These mice, when infected with trypomastigotes, showed high parasitemia and mortality that were associated with a low production of IFN- γ and IL-12 [16,17]. In addition, TLR4 knockout mice had severe parasitemia, confirming the role of TLR4 in resistance to *T. cruzi* infection [15,18]. Related to this, knockout mice for TLR2 and TLR9 (which recognizes the parasite's DNA) were more susceptible to infection by *T. cruzi* in

addition to having a low Th1 response [19]. According to previous studies, TLR9 plays a crucial role in establishing the Th1 response, while TLR2 appeared to act as an immunoregulator in the early stage of infection. Gravina and co-workers [20] investigated the role of TLRs 2 and 9 in experimental acute infection by *T. cruzi*. They observed that dendritic cells, macrophages and monocytes use these two TLRs differently during the acute phase of infection - leading to different production of TNF and IL-12 between these cells - and that only TLR9-deficient mice are susceptible to *T. cruzi* infection.

Furthermore, studies show that macrophages, dendritic cells and natural killer (NK) cells trigger a strong inflammatory response along with increased production of cytokines and chemokines [21]. Chemokines are highly conserved proteins that are involved in a high variety of biological process, especially in leukocyte migration [22]. Yet not largely explored, a great range of chemokines and their receptors have been described in the pathogenesis of Chagas disease. In the acute phase, augmented production of inflammatory cytokines (IL-12, TNF- α , and IFN- γ), and chemokines (CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, and CXCL10) have been shown [23]. In mice infected with *T. cruzi* in the acute phase, CXCL9 and CXCL10 seems to be important in the control of the parasite burden [24]. Also, in the chronic phase, it was demonstrated that Chagas disease patients also had higher serum levels of CXCL9, CXCL10 and IL-1 β with lower serum levels of CCL5 than non-infected subjects [25]. However, another study demonstrated that chronic patients that showed higher levels of CXCL9 and CXCL10 mRNA also had higher intensities of myocarditis [26].

The chemokine receptors CCR5 and CXCR3 are known as immunological markers of Th1 response, whereas CCR3 is associated with Th2 response [27]. The CCR5 receptor, receptor of CCL2, CCL3, CCL4 and CCL5, has a dual role in the pathogenesis of the disease: on the one hand, it is extremely important in the control of acute infection, on the other hand, its exacerbated expression may maintain the inflammation leading to myocardial tissue damage [28]. Together with CCR5, the CCR2 receptor is also related the different clinical manifestations of the disease [29]. It is clear that chemokines play a relevant role in Chagas disease both in the initial infection and in the chronic form of the disease.

The control of the disease also involves antibodies, CD8 + (cytotoxic) T lymphocytes and CD4 + T lymphocytes (helper, Th1 type) producing high levels of IFN- γ [30]. Studies on acute experimental models of the disease have shown the role of proinflammatory cytokines such as IFN- γ , TNF and IL-6 in resistance to *T. cruzi* infection [31,32]. On the contrary, the Th2 profile is related to disease susceptibility and the main cytokine involved is IL-4 [33].

After the initial interaction of the parasite with the cells of the innate immune response, different intracellular signals are presented, culminating in the activation of NF- κ B, production of inflammatory cytokines, connecting the innate response to the adaptive response [34]. Besides

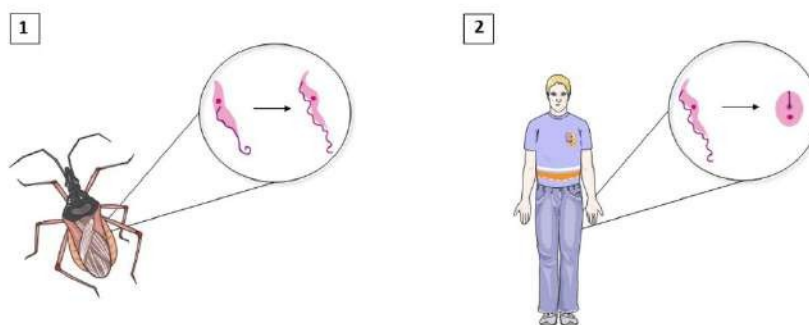


Fig. 1. Vector (1) and mammalian stages (2) of *Trypanosoma cruzi*. In the vector stages, epimastigotes and metacyclic trypomastigotes are shown. In the mammalian stages, trypomastigotes and amastigotes are shown. Some components of this figure were created using modified templates from Servier Medical Art, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License; <https://smart.servier.com>.

that, the increased production of IL-12 induced by *T. cruzi*, mainly by macrophages, interferes in the production of IFN- γ by activation of NK cells and induction of a Th1 response cells [35]. In addition, these IL-12 activated NK cells lead to the expansion of CD4 + and CD8 + T cells by the production of IFN- γ , which then produce more IFN- γ . The IFN- γ cytokine, together with TNF, also produced by innate immune response cells, and IL-12 stimulates macrophages infected with *T. cruzi* to produce nitric oxide (NO) and the expression of the induced nitric oxide synthase enzyme, which contributes to control of the intracellular division of the parasite and its elimination [36]. However, the excess of NO may also lead to tissue damage, showing its dual role and the importance of control/regulation of immune response [37]. It is important to note that IFN- γ and TNF seem to play a dual role according to the course of the disease. In the early phase of the disease, these cytokines are important to combat the parasite, but they can be harmful when produced in excess in the chronic phase [38,39].

Other cytokines may be important in the initial stages of the infection. TGF- β is one of these cytokines that regulates the parasite invasion and cardiac fibrosis. Thus, in the initial phase of infection, mice treated with GW788388 – an TGF- β inhibitor – showed decreased cardiac fibrosis and improved survival rates [40]. In mice infected with *T. cruzi* but deficient in the production of IL-6, there was an increased production of IL-1 β (important cytokine involved in NO production), NO, and inflammatory monocytes, leading to higher mortality upon infection, suggesting that IL-6 is able to modulate the inflammation [41]. Corroborating with this, orally infected mice showed significantly higher TNF, IL-6, and IFN- γ levels than controls, demonstrating that a potent pro-inflammatory systemic response can be triggered by the infection with the parasite [42].

Despite all the efforts of the immune system to fight against the infection, some molecules of the parasite can help in the escape of the immune response. One of the ways that the parasite can do it is by blocking the activation of NF- κ B, which leads to less production of the pro-inflammatory cytokine IL-12 by macrophages, through the action of the cruzain parasitic enzyme [43]. Another molecule of the parasite that interacts with the immune system and modulates it is the enzyme trans-sialidase, which is considered a parasitic virulence factor. During antigen presentation, trans-sialidase limits the pro-inflammatory response and stimulates the anti-inflammatory response through increased production of IL-10, favoring infection and persistence of the parasite in the tissues [44]. The parasite also expresses mucin-like molecules on its surface that participate in the initial parasite-host interaction, as well as evading the immune system. The sialylated form of these proteins protects the parasite from the action of antibodies, from the complement system [45], in addition to preventing the initial events of T lymphocyte activation [46]. The Fig. 1A summarizes the effort of the immune system to control the initial infection, highlighting the leading cells and the molecules evolved, apart from the clinical features in each stage of disease.

Another factor that is involved in the initial infection and, consequently, with the immune system is the strain of the parasite. A study with two strains of two different DTUs (Tcl and TcII) in acute infection showed that the strain Col cl1.7, belonging to Tcl, led to a greater activation of monocytes and production of IL-10, while Y strain, belonging to TcII, activates less monocytes, however, it causes a greater production of pro-inflammatory cytokines by peripheral mononuclear cells [47]. DTU is a set of stocks genetically more similar to each other than to any other unit and can be identified by common genetic/molecular/immunological markers [48]. In other words, the strains lead to diverse immunological outcomes and, consequently, may have different impacts on the clinical course of the disease.

In addition to the innate immune response, the adaptive immune response is extremely relevant even in the early stage of infection. A research by Menezes and co-workers [49] showed myocarditis related to the presence of CD4 + and CD8 + T lymphocytes in the acute phase of the disease, as well as of *T. cruzi* antigens. This study shows that these

cells may be involved in the pathology of acute myocarditis. CD4 + and CD8 + T lymphocytes mainly secrete IFN- γ , the main cytokine responsible for Th1 polarization in relation to Th2. On the other hand, CD8 + T lymphocytes are seen in processes related to the control of parasites in acute infection and during disease progression, and also in the chronic phase of the pathology, being likewise associated with a possible absence of activity that helps in establishing the disease [50–52]. Because of this range of influences described for these cells, it is speculated that distinct populations of CD8 + T cells may exist during disease, related to different functions [34]. One of the cytokines that influence these lymphocyte effector mechanisms, the expansion of CD4 + T and CD8 + T lymphocytes, and acute infection is IL-2 [53].

In addition to the Th1/Th2 dichotomy, Th17 cells have also been shown to help control acute infection and cardiac inflammation in the experimental model of the disease, modulating the Th1 response [54]. A study with mice in the acute phase of the disease showed that, in the absence of the IL-17 cytokine at that stage, the animals became more susceptible to infection, with lower expression of cytokines such as IFN- γ , IL-6 and TNF [55].

The acute phase lasts 2–3 months and ends when the immune system is able to control parasitemia and the level of parasites in the tissues. Despite all the immune response developed to combat the parasite, many patients evolve to the chronic form of the disease. Some of the factors involved in this evolution are the evasion of *T. cruzi* to the immune system, the strain involved in the initial infection and the host immune system [56,57].

3. Immune response in the chronic phase

In the chronic phase of Chagas disease, the clinical signs and symptoms of the patients, or the absence of these, appear to be related to the individual's immune response. It is known that there is a Th1 profile of cytokines (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12) with low level of a Th2 profile of cytokines (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13) in patients with the cardiac and digestive signs. On the other hand, the opposite is seen in the indeterminate form of Chagas, suggesting that the balance of these cytokines could play a key role in the development of the disease.

Two of the major cytokines of the proinflammatory profile, TNF and IFN- γ , are directly involved in the chronic cardiac pathology of Chagas disease in human and experimental models [11,58–60]. Due to the importance of cytokines in the development of the disease, some of them, such as TGF- β , IL-1 β and TNF, have been proposed as biomarkers of myocardial fibrosis [61]. Conversely, patients with cardiac form of the disease produce higher levels of IFN- γ – a really essential pro-inflammatory cytokine – whereas indeterminate patients showed higher levels of IL-10, one of the key regulators of IFN- γ production [62]. In addition, IL-6 was a highly expressed cytokine by patients with the cardiac form in comparison to patients with the indeterminate form, who expressed IL-10 in greater quantity [63]. Corroborating with these studies, Gómez-Olarte and co-workers [64] found that patients with the cardiac form of the disease have an increased quantity of inflammatory monocytes and IL-6 production compared to asymptomatic individuals. Thus, the type 1 immune response, while important in containing parasite replication during the acute phase as already described, may also be involved in the development of severe cardiac disease.

Regarding the indeterminate form, there is an increased expression of cytokines and transcription factors related to Th2, Th9, Th22 and Treg profiles, associated with reduced expression of proinflammatory cytokines such as IFN- γ and TNF [65,66]. Studies show a correlation between the production of inflammatory cytokines by CD4 + T cells and monocytes from patients with the cardiac form and the production of IL-10 by the same cells from asymptomatic patients [67,68]. This indicates that anti-inflammatory cytokines may help neutralize the action of pro-inflammatory cytokines and consequently may lead to reduction of tissue damage and the absence of symptoms.

Emphasizing the relevance of the immune system regulation, the

Treg cells are mostly found in patients with the indeterminate form of the disease and it is the main type of cell involved in the IL-10 production, showing the importance of these cells in the regulation of the immune response in these patients [69]. Due to this, it has been suggested that a treatment for Chagas disease should enhance Treg cells [70]. In addition, a study with patients with the cardiac form showed a higher production of IL-10 and IL-17 in the milder form of the disease and that a decrease in the function of CD4 + CD25 + T cells and lower levels of IL-17 are linked with the most severe form of disease [71]. A study corroborated these findings and also verified that in the cardiac form there is a smaller number of circulating Th17 cells in relation to the indeterminate form and to the uninfected patients [72]. A recent study of the experimental model of the disease showed that Th17 cells are more protective against *T. cruzi* infection than Th1 cells, in addition to showing that these cells can act on both extracellular and intracellular immunity [73]. The Fig. 2B shows a summary of the cytokine profile of the cardiac and indeterminate form.

It is not known what leads to an increase of the anti-inflammatory profile observed in the indeterminate form in relation to a pro-inflammatory observed in the cardiac form. This may depend on the host's genetic characteristics and age-dependent changes in the immune system, for example [74].

4. Treatment and immunological response

The treatment with Bz or Nx is limited by the stage of the disease and the high toxicity. Finding a new treatment for Chagas disease is one of the main goals to achieve its control [75]. In the Table 1, it is summarized the Target Product Profile of a new drug candidate for Chagas disease suggested by de Drug for Neglected Diseases Initiative (DNDi).

Aiming to find a new compound for the disease, different classes of compounds have been obtained based on a range of approaches, such as planned synthetic compounds and drug repurposing [76]. Much has been said about the importance of the treatment, mainly taking into account clinical manifestations, serology and parasitemia [77,78]. However, little is investigated about the influence of the treatment on the immune system, although it exerts great influence on the success of chemotherapy in many parasitic diseases, including Chagas [79]. This has been seen mainly in experimental acute *T. cruzi* infections; however, there is no strong support of this correlation in humans [80].

Table 1

Target product profile of a new drug candidate for Chagas disease suggested by the DNDi.

Target population	Ideal	Acceptable
Geographic distribution	Chronic and acute	Chronic
Contraindications	All regions	All regions
Treatment regimen	No contraindications	Pregnancy
Cost	< 30 days	Oral: any duration Parenteral: < 7 days
	Lowest as possible	Current treatments

The presence of high levels of IFN- γ in peripheral blood mononuclear cells of patients cured after treatment suggests a beneficial effect of this cytokine on the efficacy of chemotherapy [81]. That is, during the acute phase of infection, IFN- γ may act in synergy with the specific treatment to eliminate the parasites [82,83]. The beneficial relationship between cytokine balance and treatment, as found in the acute phase, was also seen in the chronic phase in patients with indeterminate and cardiac form. In the cardiac form, Camara and co-workers [84] measured the plasma of 66 patients, treated or untreated with Bz, and found out that there is a positive correlation between the treatment with Bz and myocardial function, strengthening the idea that the treatment with this drug can bring benefits. In addition, Bz seems to upregulate cell activation, antigen presentation, phagocytosis receptor and macrophage activation [85]. How it was previous discussed, in the cardiac form of the disease there is an important inflammatory component. In line with this, the cytokine profiles of chronic infected subjects treated with Bz showed lower levels of inflammatory mediators than those of the untreated *T. cruzi*-infected subjects [86], suggesting the role of Bz in regulating inflammation.

In the indeterminate form, treatment with Bz led to an induction of a pro-inflammatory profile by NK and CD8 + T cells with maintenance of IL-10, emphasizing the relevance of the regulatory environment, while in cardiac form led to lower levels of IFN- γ and higher levels of IL-10 [87]. A study conducted by Mateus and co-workers [88] with chronically infected individuals, showed that treatment with Bz improved the antigen-specific T CD8 + response, decreasing the coexpression of inhibitory molecules in these cells and increasing the functional capacity of these cells (observed by increasing production of cytokines and

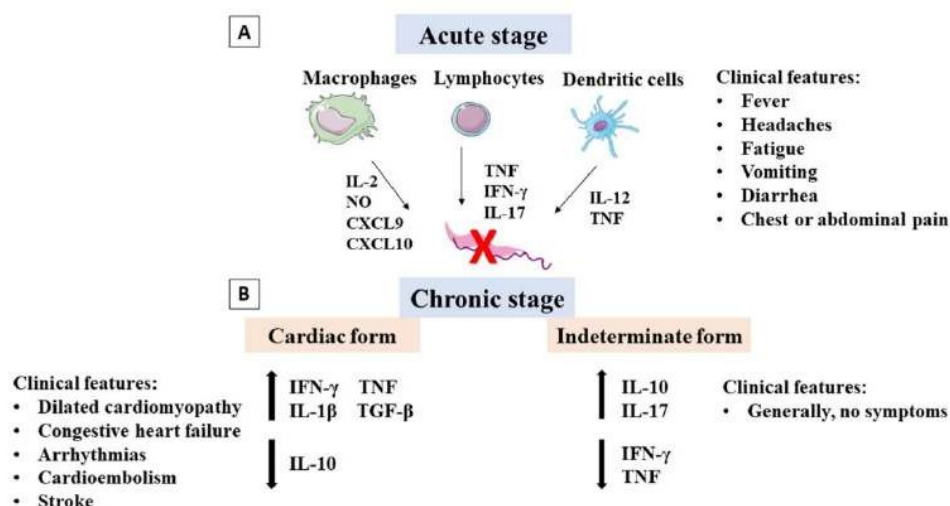


Fig. 2. Immunological and clinical profile of acute and chronic cardiac stages of Chagas disease. Some components of this figure were created using modified templates from Servier Medical Art, which are licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 Unported License; <https://smart.servier.com>.

cytotoxic molecules). In line with this, a study by Pérez-Antón and co-workers concluded that treatment with benznidazole in chronically infected people reversed the process of exhaustion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells and increased the responsiveness of these lymphocytes (increase in cells expressing IL-2 and TNF) [89,90]. This process of exhaustion of T lymphocytes has been reported in the literature. It occurs due to continuous exposure to parasitic antigens, triggering a dysfunctional response of T lymphocytes by decreasing the ability to produce cytokines and cytotoxic molecules against the infectious agent, in addition to inducing a progressive increase in the expression and coexpression of inhibitory molecules in the cell membrane [91]. In an analysis with 4 years after Bz-treatment subjects, patients who had progressed to the cardiac form, or had a worsening in the cardiac symptoms, showed elevated levels of IFN- γ and Th1 cells, while those subjects who remained in the indeterminate form were associated with lower IFN- γ levels and inflammatory/anti-inflammatory balance favoring IL-10 and Tregs [92]. Altogether, this reinforces the importance of treatment regulation between pro- and anti-inflammatory profiles in the context of Chagas disease.

Despite all that, a multicentric study conducted recently to assess if there is advantage in treating chronic cardiac patients with Bz (BENEFIT) showed that there is no profit in using this treatment in this group of patients [93]. It is important to note that a wide range of genes, including these related to the immune system, are dysregulated in chronic Chagas disease, especially in the cardiac form [94], and this may justify the difficulty in obtaining benefits from treatment at this stage of the disease [95]. However, another multicentric study is being conducted aiming to know if different dosages, times of treatment, and association of Bz with fosravuconazole could lead to clinical benefits in adults with chronic Chagas disease. Initial results have shown that Bz showed antiparasitic activity in all treatments, not depending on duration, dose, or combination with fosravuconazole [96]. This shows the importance of continuing to research the influence of treatment on the chronic phase of the disease, including the participation of the immune system, to better understand how it influences in treatment success.

On one hand, the range of immunological profiles involved in the pathology of the disease reinforce the importance to investigate how a possible new treatment can act on the immune system, helping to combat the development of the disease. On the other hand, this immunological aspect is poorly investigated when it comes to new drugs for the disease. A variety of compound classes has been tested for Chagas disease and some privileged structures, especially those related to phthalimide, thiosemicarbazones, thiazoles and 4-thiazolidinones are being considered promising anti-*T. cruzi* and immunomodulatory scaffolds [97]. Gomes and colleagues tested both phthalimido-thiosemicarbazones and phthalimido-thiazole derivatives in vitro and found 3 compounds with anti-*T. cruzi* activity lower than 5 μ M [98]. In a work that tested thiosemicarbazones derivatives, the C3 compound showed anti-*T. cruzi* activity in vitro and in vivo, in addition to decreasing the release of trypomastigotes from cardiomyocytes without depending on NO, TNF, and IL-6 production [99]. Álvarez and collaborators synthesized and tested thiazole derivatives and it was possible to find a molecule that diminishes mononuclear inflammatory infiltrates in the heart of mice infected with *T. cruzi* [100]. Two of the 4-thiazolidinones chlorine derivatives tested against *T. cruzi* – compounds 2c and 3a – showed antiparasitic activity independent of NO release [101].

Due to all this, it is clear that immunotherapy and the development of immunomodulatory compounds is an important approach in the context of Chagas disease. It is important to note that immunological parameters, such as changes in cytokines/chemokines production and cell activity, can be useful in the drug discovery field and to monitor treatment efficacy [80,102,103].

5. Conclusion

The existing antithesis between autoimmunity and inflammation resulting from parasitic persistence promoted a delay in the study of new drugs to treat the disease and, consequently, delayed the development of studies on the influence of treatment on the immune system, that is, immunomodulation studies in Chagas. Although there are immunological studies in animals and humans that show differences between the immunological profile in the acute and chronic stages, there is no consensus regarding the pathogenesis of Chagas disease and what is the ideal immune response to promote its cure or permanence in the indeterminate chronic form. The design and obtention of immunomodulatory compounds have grown in parallel as a strategy for therapeutic approaches in parasitic diseases, since the immunological profiles involved in the pathology of Chagas disease show that the involvement of the host's immune response can play an important role in the efficacy of chemotherapy. Therefore, it is important to investigate how a drug candidate might act on the immune system, and the complexity of the possible immunological responses. These gaps must be fulfilled in order to achieve more effective strategies for therapeutic interventions. It is known that a range of immunological profiles are involved in the pathology of the disease and there is a great need for further studies in the area to help in the development of more efficient strategies for its treatment and prophylaxis. In addition, little research is done on the influence of treatment on the immune system, although the number of studies suggesting that its involvement may play an important role in the efficacy of chemotherapy is gradually growing. With this in mind, it is extremely important that researchers start to give focus on the immune system in the drug discovery strategies for Chagas disease.

Funding

ACCS is the recipient of a Ph.D. fellowship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil).

Author contributions

ACCS and MCABC wrote the manuscript. VRAP and MZH contributed to the discussion of the draft and made final corrections.

Declaration of Competing Interest

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

References

- [1] L. America, Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates, *Wkly. Epidemiol. Rec.* 90 (2015) 33–43.
- [2] M.J. Morilla, E.L. Romero, Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis, *Nanomedicine* 10 (2015) 465–481, <https://doi.org/10.2217/nnm.14.185>.
- [3] D.L. Longo, C. Bern, Chagas' disease, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 456–466, <https://doi.org/10.1056/NEJMr1410150>.
- [4] F.A. Monteiro, C. Weirauch, M. Felix, C. Lazoski, F. Abad-Franch, Evolution, systematics, and biogeography of the triatominae, vectors of chagas disease, *Adv. Parasitol.* 99 (2018) 265–344, <https://doi.org/10.1016/ts.apar.2017.12.002>.
- [5] M.S. Lo Presti, P.C. Bazán, M. Strauss, A.L. Báez, H.W. Rivarola, P.A. Paglini-Oliva, Trypanothione reductase inhibitors: overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease, *Acta Trop.* 145 (2015) 79–87, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.012>.
- [6] A. Rassi, A. Rassi, J.A. Marin-Neto, Chagas disease, *Lancet* 375 (2010) 1388–1402, [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).
- [7] S. Roure, L. Valerio, X. Vallès, B. Morales, M.I. García-Díaz, M.L. Pedro Botet, J. Serra, Oesophageal motility disorders in infected immigrants with Chagas disease in a non-endemic European area, *United Eur. Gastroenterol. J.* 4 (2016) 614–620, <https://doi.org/10.1177/2050640616630856>.
- [8] F.S. Machado, K.M. Tyler, F. Brant, L. Esper, M.M. Teixeira, H.B. Tanowitz, Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. *Front. Biosci. (Elite Ed.)* 4

- (2012) 1743–1758. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3428507/>. (https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023).
- [9] K.M. Bonney, D.M. Engman, Autoimmune pathogenesis of chagas heart disease: looking back, looking ahead, *Am. J. Pathol.* 185 (2015) 1537–1547, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2014.12.023>.
- [10] M.C. Fernandes, N.W. Andrews, Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: a unique strategy that promotes persistence, *FEMS Microbiol. Rev.* 36 (2012) 734–747, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2012.00333.x>.
- [11] M.M. Rodrigues, A.C. Oliveira, M. Bellio, The immune response to *Trypanosoma cruzi*: role of toll-like receptors and perspectives for vaccine development, *J. Parasitol. Res.* 2012 (2012), 507874, <https://doi.org/10.1155/2012/507874>.
- [12] M.A.S. Campos, I.C. Almeida, O. Takenchi, S. Akira, E.P. Valente, D.O. Procopio, L.R. Travassos, J.A. Smith, D.T. Golenbock, R.T. Gazzinelli, Activation of toll-like receptor 2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite, *J. Immunol.* 167 (2001) 416–423, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.1.416>.
- [13] C. Ropert, R.T. Gazzinelli, Signaling of immune system cells by glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor and related structures derived from parasitic protozoa, *Curr. Opin. Microbiol.* 3 (2000) 395–403, [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00111-9](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00111-9).
- [14] I.C. Almeida, R.T. Gazzinelli, Proinflammatory activity of glycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and functional analyses, *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001) 467–477, <https://doi.org/10.1189/jlb.70.4.467>.
- [15] A. C. Oliveira, J.R. Peixoto, L.B. de Arruda, M.A. Campos, R.T. Gazzinelli, D. T. Golenbock, S. Akira, J.O. Previato, L. Mendonça-Previato, A. Nobrega, M. Bellio, Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *trypanosoma cruzi* glycosylphosphatidylinositol and higher resistance to infection with *T. cruzi*, *J. Immunol.* 173 (2004) 5688–5696, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.173.9.5688>.
- [16] R.T. Gazzinelli, E.Y. Denkers, Protozoan encounters with Toll like receptor signalling pathways: implications for host parasitism, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 895–906, <https://doi.org/10.1038/nri1978>.
- [17] P.A. Jiménez, J.F. Jaimes, J.D. Ramírez, *Trypanosoma cruzi*. *Handb. Foodborne Dis.* 2019, pp. 655–666, <https://doi.org/10.1201/b22030-60>.
- [18] A.C. Oliveira, B.C. de Alencar, F. Tzelepis, W. Klezewska, R.N. da Silva, F. S. Neves, G.S. Cavalcanti, S. Boscardin, M.P. Nunes, M.F. Santiago, A. Nobrega, M.M. Rodrigues, M. Bellio, Impaired innate immunity in Tlr4^{-/-} mice but preserved CD8⁺ T cell responses against *trypanosoma cruzi* in Tlr4^{-/-}, Tlr2^{-/-}, Tlr9^{-/-} or myd88-deficient mice, *PLoS Pathog.* 6 (2010) 1–16, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000870>.
- [19] A. Bafica, H.C. Santiago, R. Goldszmid, C. Ropert, R.T. Gazzinelli, A. Sher, Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection, *J. Immunol.* 177 (2006) 3515–3519, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.6.3515>.
- [20] H.D. Gravina, L. Antonelli, R.T. Gazzinelli, C. Ropert, Differential use of TLR2 and TLR9 in the regulation of immune responses during the infection with *Trypanosoma cruzi*, *PLoS One* 8 (2013), e63100, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063100>.
- [21] D.V. Andrade, K.J. Gollub, W.O. Dutra, Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) 1–10, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003010>.
- [22] M.C. Miller, K.H. Mayo, Chemokines from a structural perspective, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) 1–16, <https://doi.org/10.3390/ijms18102088>.
- [23] T. Qidwai, M.Y. Khan, Impact of genetic variations in C-C chemokine receptors and ligands on infectious diseases, *Hum. Immunol.* 77 (2016) 961–971, <https://doi.org/10.1016/j.humimm.2016.06.010>.
- [24] J.L. Hardison, R.A. Wrightman, P.M. Carpenter, T.E. Lane, J.E. Manning, The chemokines CXCL9 and CXCL10 promote a protective immune response but do not contribute to cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*, *Infect. Immun.* 74 (2006) 125–134, <https://doi.org/10.1128/IAI.74.1.125-134.2006>.
- [25] F.F. De Araújo, K.C. Lima Torres, S. Viana Peixoto, A.L. Pinho Ribeiro, J. Vaz Melo Mambri, V. Bortolo Rezende, M.L. Lima Silva, A.I. Loyola Filho, A. Teixeira-Carvalho, M.F. Lima-Costa, O.A. Martins-Filho, CXCL9 and CXCL10 display an age-dependent profile in Chagas patients: a cohort study of aging in Bambuí, Brazil, *Infect. Dis. Poverty.* 9 (2020) 1–10, <https://doi.org/10.1186/s40249-020-00663-w>.
- [26] L.G. Nogueira, R.H.B. Santos, B.M. Ianni, A.I. Fiorelli, E.C. Mairana, L. A. Benvenuti, A. Frade, E. Donadi, F. Dias, B. Saba, H.T.L. Wang, A. Fragata, M. Sanpaio, M.H. Hirata, P. Buck, C. Mady, E.A. Bocchi, N.A. Stolf, J. Kalil, E. Cunha-Neto, Myocardial chemokine expression and intensity of myocarditis in chagas cardiomyopathy are controlled by polymorphisms in CXCL9 and CXCL10, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) 1867, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001867>.
- [27] S. Qin, J.B. Rottman, P. Myers, N. Kassam, M. Weinblatt, M. Loetscher, A.E. Koch, B. Moser, C.R. Mackay, The chemokine receptors CXCR3 and CCR5 mark subsets of T cells associated with certain inflammatory reactions, *J. Clin. Invest.* 101 (1998) 746–754, <https://doi.org/10.1172/JCI11422>.
- [28] A.P. de Oliveira, C.M. Ayo, R.B. Bostetti, C.C. Brandão de Mattos, C.E. Gvasini, L. C. de Mattos, The role of CCR5 in Chagas disease – a systematic review, *Infect. Genet. Evol.* 45 (2016) 132–137, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.08.012>.
- [29] Y. Ortega Zamora, L.J. Escamilla Rojas, E.M. Villa Sandoval, J.S. Vela Porras, E. Y. Cossio Contreras, S.S. Cubides Romero, P.D. Carreño Ramírez, H. Urrutia Losada, C. De los Rios, D.A. Gomez Mahecha, K.D. Lovera Serrano, J.C. Barreto Montaña, V.L. Narvaez Caicedo, F.R.S. Gutierrez, Chagas disease immunogenetics: elusive markers of disease progression, *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 15 (2017) 367–376, <https://doi.org/10.1080/14779072.2017.1317591>.
- [30] R.L. Tarleton, Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease, *Int. J. Parasitol.* 31 (2001) 550–554, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00158-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00158-8).
- [31] F.S. Machado, G. a Martins, J.C. Aliberti, F.L. Mestriner, F.Q. Cunha, J.S. Silva, *Trypanosoma cruzi* infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity, *Circulation* 102 (2000) 3003–3008, <https://doi.org/10.1161/01.CIR.102.24.3003>.
- [32] W. Gao, M.A. Pereira, Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. Parasitol.* 32 (2002) 167–170, [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00322-8](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00322-8).
- [33] K. Hiyama, S. Hamano, T. Nakamura, K. Nonoto, I. Tada, IL 4 reduces resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* infection, *Parasitol. Res.* 87 (2001) 269–274, <https://doi.org/10.1007/PL00008577>.
- [34] F.S. Machado, W.O. Dutra, L. Esper, K.J. Gollub, M.M. Teixeira, S.M. Factor, L. M. Weiss, F. Nagajothi, H.B. Tanowitz, N.J. Garg, Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease, *Semin. Immunopathol.* 34 (2012) 753–770, <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0351-7>.
- [35] H. Kayama, K. Takeda, The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection, *Microbes Infect.* 12 (2010) 511–517, <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2010.03.005>.
- [36] A.L.A. Dos Santos, L.F. Carvalho Kelly, C.F. Dick, J.R. Meyer-Fernandes, Innate immunomodulation to trypanosomatid parasite infections, *Exp. Parasitol.* 167 (2016) 67–75, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.05.005>.
- [37] V.L.H. Tatakibara, A.D. Malvezi, C. Panis, R. Cecchini, N.G. Zanluchi, L. M. Yamauchi, M.L.L. Martins, R.V. Da Silva, S.F. Yamada Ogata, L.V. Rizzo, M. C. Martins Pinge, P. Pinge Filho, Nitric oxide releasing indomethacin enhances susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection acting in the cell invasion and oxidative stress associated with anemia, *Chem. Biol. Interact.* 227 (2015) 104–111, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2014.12.024>.
- [38] J.S. Cruz, F.S. Machado, C. Ropert, D. Roman-Campos, Molecular mechanisms of cardiac electromechanical remodeling during Chagas disease: Role of TNF and TGF- β , *Trends Cardiovasc. Med.* 27 (2017) 81–91, <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2016.08.003>.
- [39] L.R.P. Ferreira, Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy, *World J. Cardiol.* 6 (2014), <https://doi.org/10.4330/wjcv.v6.i8.782>, 782–90.
- [40] R.R. Ferreira, R. da S. Abreu, G. Vilar-Pereira, W. Degraive, M. Meuser-Batista, N. V.C. Ferreira, O. da Cruz Moreira, N.L. da Silva Gomes, E. Mello de Souza, I. P. Ramos, S. Bailly, J.J. Feige, J. Lannes Vieira, T.C. de Araújo Jorge, M. C. Waghbi, TGF- β inhibitor therapy decreases fibrosis and stimulates cardiac improvement in a pre-clinical study of chronic Chagas' heart disease, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13 (2019) 1–27, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007602>.
- [41] L.M. Sanmarco, L.M. Visconti, N. Eberhardt, M.C. Ramello, N.E. Ponce, N. B. Spitali, M.L. Voza, G.A. Bernardi, S. Gea, A.R. Minguez, M.P. Aoki, IL-6 improves the nitric oxide-induced cytotoxic CD8⁺ T cell dysfunction in human chagas disease, *Front. Immunol.* 7 (2016) 626, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2016.00626>.
- [42] D. Antunes, A. Martins Dos Santos, M.T. Ramos, B.A.S. Mascarenhas, C.J. De Carvalho Moreira, D.A. Farias-De-Oliveira, W. Savino, R.Q. Monteiro, J. De Meis, Oral route driven acute *Trypanosoma cruzi* infection unravels an IL-6 dependent homeostatic derangement, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1–10, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01073>.
- [43] P.S. Doyle, Y.M. Zhou, I. Hsieh, D.C. Greenbaum, J.H. McKerrrow, J.C. Engel, The *trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion, *PLoS Pathog.* 7 (2011) 1–11, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002139>.
- [44] P.R. Díaz, J. Mucci, M.A. Meira, Y. Bogliotti, D. Muskat, M.S. Leguizamón, O. Campetella, *Trypanosoma cruzi* trans sialidase prevents elicitation of Th1 cell response via interleukin 10 and downregulates Th1 effector cells, *Infect. Immun.* 83 (2015) 2099–2108, <https://doi.org/10.1128/IAI.00931-15>.
- [45] L.M. da Fonseca, K.M. da Costa, V. de S. Chaves, C.G. Freire-de-Lima, A. Morrot, L. Mendonça Previato, J.O. Previato, L. Freire de Lima, Theft and reception of host cell's sialic acid: dynamics of *trypanosoma cruzi* trans sialidases and mucin-like molecules on chagas' disease immunomodulation, *Front. Immunol.* 10 (2019) 164, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00164>.
- [46] P. Alcaide, M. Fresno, The *Trypanosoma cruzi* membrane mucin AgC10 inhibits T cell activation and IL-2 transcription through L selectin, *Int. Immunol.* 16 (2004) 1365–1375, <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh138>.
- [47] L.M.D. Magalhães, A. Viana, E. Chiari, L.M.C. Galvão, K.J. Gollub, W.O. Dutra, Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015), e0003816, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003816>.
- [48] B. Zingales, M.A. Miles, D.A. Campbell, M. Tibayrenc, A.M. Macedo, M.M. G. Teixeira, A.G. Schijman, M.S. Llewellyn, E. Lages Silva, C.R. Machado, S. G. Andrade, N.R. Sturm, The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications, *Infect. Genet. Evol.* 12 (2012) 240–253, <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.009>.
- [49] C.A.S. Menezes, M.O.C. Rocha, P.E.A. Souza, A.C.L. Chaves, K.J. Gollub, W. O. Dutra, Phenotypic and functional characteristics of CD28⁺ and CD28⁻ cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression, *Clin. Exp. Immunol.* 137 (2004) 129–138, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2004.02479.x>.
- [50] R.P. Costa, K.J. Gollub, L.L. Fonseca, M.O.C. Rocha, A.C.L. Chaves, N. Medrano-Mercado, T.C. Arau, A. Jo-Jorge, P.R.Z. Antas, D.G. Colley, R. Correa-oliveira,

- G. Gazzinelli, J. Carvalho-Parra, W.O. Dutra, T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of V β 5 expressing T cells, *Scand. J. Immunol.* 51 (2000) 511–519.
- [51] M.C. Albareda, S.A. Laucella, M.G. Alvarez, A.H. Arment, G. Bertochi, R. L. Tarleton, M. Postan, Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8 + T cells in chronic Chagas' disease patients, *Int. Immunol.* 18 (2006), <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh387>, 465–71.
- [52] W.O. Dutra, D.G. Colley, J.C. Pinto Dias, G. Gazzinelli, Z. Brener, M.E.S. Pereira, R.L. Coffman, R. Correa-Oliveira, J.F. Carvalho-Parra, Self and nonself stimulatory molecules induce preferential expansion of CD5+B cells or activated T cells of chagasic patients, respectively, *Scand. J. Immunol.* 51 (2000) 91–97, <https://doi.org/10.1046/j.1365.3083.2000.00648.x>.
- [53] D. Martin, R. Tarleton, Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in Trypanosoma cruzi infection, *Immunol. Rev.* 201 (2004) 304–317, <https://doi.org/10.1111/j.0105.2896.2004.00183.x>.
- [54] P.M.D.M. Guedes, F.R.S. Gutierrez, F.L. Maia, C.M. Milanezi, G.K. Silva, W. R. Pavanelli, J.S. Silva, IL-17 is necessary for host protection against acute phase Trypanosoma cruzi infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010), e004, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000604>.
- [55] Y. Miyazaki, S. Hanano, S. Wang, Y. Shimano, Y. Iwakura, H. Yoshida, IL-17 is necessary for host protection against acute phase Trypanosoma cruzi infection, *J. Immunol.* 185 (2010) 1150–1157, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900047>.
- [56] F. Nagajyothi, F.S. Machado, B.A. Burleigh, L.A. Jelicks, P.E. Scherer, S. Mukherjee, M.P. Lisanti, L.M. Weiss, N.J. Garg, H.B. Tanowitz, Mechanisms of Trypanosoma cruzi persistence in Chagas disease, *Cell. Microbiol.* 14 (2012) 634–643, <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2012.01764.x>.
- [57] C.M. Rodrigues, H.M.S. Valadares, A.F. Francisco, J.M. Arantes, C.F. Campos, A. Teixeira-Carvalho, O.A. Martins-Filho, M.S.S. Araujo, R.M.E. Arantes, E. Chiari, G.R. Franco, C.R. Machado, S.D.J. Pena, A.M.C. Faria, A.M. Macedo, Coinfection with different Trypanosoma cruzi strains interferes with the host immune response to infection, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) 5–10, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000846>.
- [58] L. Criado, O. Florez, J. Martín, C.I. González, Genetic polymorphisms in TNFA/ TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population, *Cytokine* 57 (2012) 398–401, <https://doi.org/10.1016/j.cyt.2011.12.007>.
- [59] I.R. Pereira, G. Vilar Pereira, A.A. Silva, O.C. Moreira, C. Brito, E.D.M. Sarmiento, J. Lannes-Vieira, Tumor necrosis factor is a therapeutic target for immunological imbalance and cardiac abnormalities in chronic experimental chagas' heart disease, *Mediators Inflamm.* 2014 (2014), 798078, <https://doi.org/10.1155/2014/798078>.
- [60] M. Torzewski, P. Wenzel, H. Kleiart, C. Becker, J. El-Masri, E. Wiese, M. Brandt, A. Pautz, L. Twardowski, E. Schmitt, T. Münzel, K. Reifensberg, Chronic inflammatory cardiomyopathy of interferon γ overexpressing transgenic mice is mediated by tumor necrosis factor- α , *Am. J. Pathol.* 180 (2012) 73–81, <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.006>.
- [61] A.T. Chaves, C.A.S. Menezes, H.S. Costa, M.C.P. Nunes, M.O.C. Rocha, Myocardial fibrosis in chagas disease and molecules related to fibrosis, *Parasite Immunol.* 41 (2019) 1–7, <https://doi.org/10.1111/pim.12663>.
- [62] C. Chevillard, J.P.S. Nunes, A.F. Frade, R.R. Almeida, R.P. Pandey, M. S. Nascimento, J. Kall, E. Cunha-Neto, Disease tolerance and pathogen resistance genes may underlie trypanosoma cruzi persistence and differential progression to chagas disease cardiomyopathy, *Front. Immunol.* 9 (2018) 2791, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.02791>.
- [63] G.R. Sousa, J.A.S. Gomes, R.C.G. Fares, M.P.D.S. Damásio, A.T. Chaves, K. S. Ferreira, M.C.P. Nunes, N.I. Medeiros, V.A.A. Valeute, R. Corrêa-Oliveira, M.O. D.C. Rocha, Plasma cytokine expression is associated with cardiac morbidity in Chagas disease, *PLoS One* 9 (2014) 1–9, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087082>.
- [64] S. Gómez-Olarte, N.I. Bolaños, M. Echeverry, A.N. Rodríguez, A. Cuéllar, C. J. Puerta, A. Mariño, J.M. González, Intermediate monocytes and cytokine production associated with severe forms of Chagas disease, *Front. Immunol.* 10 (2019) 1671, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01671>.
- [65] P.M.M. Guedes, C.M. de Andrade, D.F. Nunes, N. de Sena Pereira, T.B. De Queiroga, G.L.L. Machado Coelho, M.S.L. Nascimento, M.A. Do Valle Matta, A. C.J. da Camara, E. Chiari, L.M. da C. Galvão, Inflammation enhances the risks of stroke and death in chronic Chagas disease patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) 1–18, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004669>.
- [66] V. do, C.G. Souza, J.T. dos Santos, F.L. Cabral, F. Barbas, M.I. Azevedo, L.F. Dias Carli, S. de Avila Botton, J.A. dos Santos Jaques, D.B. Rosa Leal, Evaluation of P2 $\times$ 7 receptor expression in peripheral lymphocytes and immune profile from patients with indeterminate form of Chagas disease, *Microb. Pathog.* 104 (2017) 32–38, <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.002>.
- [67] P.E.A. Souza, M.O.C. Rocha, E. Rocha-Vicira, C.A.S. Menezes, A.C.L. Chaves, K. J. Gollub, W.O. Dutra, Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity, *Infect. Immun.* 72 (2004) 5283–5291, <https://doi.org/10.1128/IAI72.9.5283-5291.2004>.
- [68] P.E.A. Souza, M.O.C. Rocha, C.A.S. Menezes, J.S. Coelho, A.C.L. Chaves, K. J. Gollub, W.O. Dutra, Trypanosoma cruzi infection induces differential modulation of costimulatory molecules and cytokines by monocytes and T cells from patients with indeterminate and cardiac Chagas' disease, *Infect. Immun.* 75 (2007) 1886–1894, <https://doi.org/10.1128/IAI01931-06>.
- [69] F.F. de Araújo, R. Corrêa-Oliveira, M.O.C. Rocha, A.T. Chaves, J.A. Fiuza, R.C. G. Fares, K.S. Ferreira, M.C.P. Nunes, T.S. Keesen, M.P.S. Damásio, A. Teixeira-Carvalho, J.A.S. Gomes, Foxp3 + CD25 high CD4 + regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity, *Immunobiology* 217 (2012) 768–777, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2012.04.008>.
- [70] F.B. González, S.R. Villar, R. Fernández Bussey, G.H. Martín, L. Pérol, R. Manarín, S.V. Spinelli, C. Pilon, J.L. Cohen, O.A. Bottasso, E. Piaggio, A.R. Pérez, Immunoendocrine dysbalance during uncontrolled T. cruzi infection is associated with the acquisition of a Th-1-like phenotype by Foxp3+ T cells, *Brain. Behav. Immun.* 45 (2015) 219–232, <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.11.016>.
- [71] P.M.M. Guedes, F.R.S. Gutierrez, G.K. Silva, R. Dellalibera-Joviliano, G. J. Rodrigues, L.M. Bendhack, A. Rassi, A. Rassi, A. Schmidt, B.C. Maciel, J. A. Marin Neto, J.S. Silva, Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17 producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (2012) 1630, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001630>.
- [72] L.M.D. Magalhães, F.N.A. Villani, M. do, C.P. Nunes, K.J. Gollub, M.O.C. Rocha, W.O. Dutra, High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease, *J. Infect. Dis.* 207 (2013) 661–665, <https://doi.org/10.1093/infdis/jis724>.
- [73] C.W. Cai, J.R. Blase, X. Zhang, C.S. Eickhoff, D.F. Hoft, Th17 cells are more protective than Th1 cells against the intracellular parasite Trypanosoma cruzi, *PLoS Pathog.* 12 (2016) 1–23, <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005902>.
- [74] M. Acosta-Herrera, M. Strauss, D. Casares-Marfil, J. Martín, Genomic medicine in Chagas disease, *Acta Trop.* 197 (2019), 105062, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105062>.
- [75] A.L. Porras, Z.E. Yadan, J. Altchek, C. Britto, G.C. Chaves, L. Fleveaud, O. A. Martins-Filho, I. Ribeiro, A.G. Schijman, M.A. Shikanai-Yasuda, S. Sosa-Estani, E. Stobbaerts, F. Zicker, Target product profile (TPP) for chagas disease point-of-care diagnosis and assessment of response to treatment, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9 (2015) 1–8, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003697>.
- [76] A.C. Cristóvão-Silva, M.C.A. Brelaz-De-Castro, A.C. Lima Leite, V.R. Alves Pereira, M.Z. Hernandez, Chagas disease treatment and rational drug discovery: a challenge that remains, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 1–6, <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00873>.
- [77] L.E. Echeverría, C.A. Morillo, A. American Trypanosomiasis (Chagas Disease) Chagas disease Cardiomyopathy Heart failure Trypanosomiasis Parasitology, 33, 2019, 119–134.
- [78] A.A. Fragata Filho, F.F. Franca, C. da, S. Fragata, A.M. Lourenço, C.C. Faccini, C. A. de, J. Costa, Evaluation of parasiticidal treatment with benznidazole in the electrocardiographic, clinical, and serological evolution of Chagas Disease, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) 1–12, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004508>.
- [79] H. Yousofi Darani, M. Yousefi, M. Safari, R. Jafari, Parasites and immunotherapy: with or against? *J. Parasit. Dis.* 40 (2016) 217–226, <https://doi.org/10.1007/s12639-014-0533-4>.
- [80] M.C. Albareda, S.A. Laucella, Modulation of Trypanosoma cruzi-specific T cell responses after chemotherapy for chronic chagas disease, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 110 (2015) 414–421, <https://doi.org/10.1590/0074-02760140386>.
- [81] L.M.G. Bahia-Oliveira, J.A.S. Gomes, J.R. Cancado, T.C. Ferrari, E.M. Lemos, Z.M. P. Luz, M.C. Moreira, G. Gazzinelli, R. Correa-Oliveira, Immunological and Clinical Evaluation of Chagasic Patients Subjected to Chemotherapy during the Acute Phase of Trypanosoma cruzi Infection 14–30 Years Ago, 2000.
- [82] M.L. Ferraz, R.T. Gazzinelli, R.O. Alves, J.A. Urbina, A.J. Romanin, The anti-Trypanosoma cruzi activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 1359–1364, <https://doi.org/10.1128/AAC.01170-06>.
- [83] A.J. Romanin, R.O. Alves, S.M.F. Murta, J.S. Silva, C. Ropert, R.T. Gazzinelli, Experimental chemotherapy against Trypanosoma cruzi infection: essential role of endogenous interferon- γ in mediating parasitologic cure, *J. Infect. Dis.* 186 (2002) 823–828, <https://doi.org/10.1086/342415>.
- [84] E.J.N. Camara, V.R.R. Mendonça, L.C.L. Souza, J.S. Carvalho, R.A. Lessa, R. Gatto, L.O. Burroto, G. Chiachio, E. Amarante, M. Cunha, L.S. Alves Silva, B.A. C. Guimarães, M. Barral Netto, Elevated IL-17 levels and echocardiographic signs of preserved myocardial function in benznidazole-treated individuals with chronic Chagas' disease, *Int. J. Infect. Dis.* 79 (2019) 123–130, <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2018.11.369>.
- [85] A.K.A. Soares, P.A.F. Neves, A.V. Nascimento, A.A.M. Esmeraldo, L.R. Moreira, T. M.M. Higino, R.C.B.Q. Figueiredo, M.G.A.M. Cavalcanti, S.M. Martins, C. Carrazzone, W.O. Júnior, Y.M. Gomes, V.M.B. Lorena, Benznidazole: hero or villain of cellular immune response in chronic Chagas disease patients? *Immunobiology* 226 (2021), 152046 <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152046>.
- [86] M.D. Castro Eiro, M.A. Natale, M.G. Alvarez, H. Shen, R. Viotti, B. Lococo, J. Bua, M. Nuñez, G.L. Bertocchi, M.C. Albareda, G. Cesar, R.L. Tarleton, S.A. Laucella, Reduced Trypanosoma cruzi-specific humoral response and enhanced T cell immunity after treatment interruption with benznidazole in chronic Chagas disease, *J. Antimicrob. Chemother.* 76 (2021) 1580–1592, <https://doi.org/10.1093/jac/dkab054>.
- [87] A.C. Campi-Azevedo, J.A.S. Gomes, A. Teixeira-Carvalho, D. Silveira-Lemos, D. M. Vitelli Avelar, R. Sathler-Avelar, V. Perutype Magalhães, S.R. Bela, K. F. Silvestre, M.A. Batista, N.C.C. Schlachnik, R. Correa-Oliveira, S.M. Eloi-Santos, O.A. Martins-Filho, Etiological treatment of Chagas disease patients with benznidazole lead to a sustained pro-inflammatory profile counterbalanced by modulatory events, *Immunobiology* 220 (2015) 564–574, <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2014.12.006>.
- [88] J. Mateus, E. Pérez-Antón, P. Lasso, A. Egui, N. Roa, B. Carrilero, J.M. González, M.C. Thomas, C.J. Puerta, M.C. López, A. Cuéllar, Antiparasitic treatment induces

- an improved CD8 + T cell response in chronic chagasic patients, *J. Immunol.* 198 (2017) 3170–3180, <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1602095>.
- [89] E. Pérez-Antón, A. Egui, M.C. Thomas, C.J. Puerta, J.M. González, A. Cuellar, M. Segovia, M.C. López, Impact of benznidazole treatment on the functional response of *Trypanosoma cruzi* antigen-specific CD4+CD8+T cells in chronic Chagas disease patients, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12 (2018) 1–22, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006480>.
- [90] E. Pérez-Antón, A. Egui, M.C. Thomas, B. Carrilero, M. Simón, M.A. López-Ruz, M. Segovia, M.C. López, A proportion of cd4+ t cells from patients with chronic chagas disease undergo a dysfunctional process, which is partially reversed by benznidazole treatment, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15 (2021) 1–25, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009059>.
- [91] V. Rodrigues, A. Cordeiro-da-Silva, M. Laforge, A. Ouassii, K. Akharid, R. Silvestre, J. Estaquier, Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8 (2014) 2567, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002567>.
- [92] V.R. Mauricio Llaguno, Marcos Vinicius da Silva, Lara Rocha Batista, Djalma Alexandre Alves da Silva, Rodrigo Cunha de Sousa, Luiz Antonio Perilli Rodrigues de Resende, Valdo Jose Dias da Silva, Eliane Lages Silva, Carlo José Freire Oliveira, Juliana Reis Mach, T-Cell Immunophenotyping and Cytokine Production Analysis in Patients with Chagas Disease 4 Years after Benznidazole Treatment, 87, 2019, 1–11.
- [93] C.A. Morillo, J.A. Marin-Neto, A. Avezum, S. Sosa-Estani, A. Rassi, F. Rosas, E. Villena, R. Quiroz, R. Bonilla, C. Britto, F. Gühl, E. Velazquez, L. Bonilla, B. Meeks, P. Rao-Melacini, J. Pogue, A. Mattos, J. Lazdins, A. Rassi, S.J. Connolly, S. Yusuf, Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy, *N. Engl. J. Med.* 373 (2015) 1295–1306, <https://doi.org/10.1056/nejmoa1507574>.
- [94] L. Laugier, A.F. Prade, F.M. Ferreira, M.A. Baron, P.C. Teixeira, S. Cabantous, L.R. P. Ferreira, L. Louis, V.O.C. Rigaud, F.A. Gaiotto, F. Bacal, P. Pomerantz, E. Bocchi, J. Kalil, R.H.B. Santos, E. Cunha-Neto, C. Chevallier, Whole-Genome Cardiac DNA Methylation Fingerprint and Gene Expression Analysis Provide New Insights in the Pathogenesis of Chronic Chagas Disease Cardiomyopathy, *Clin. Infect. Dis.* 65 (2017) 1103–1111, <https://doi.org/10.1093/cid/cix506>.
- [95] P.S.G. Farani, K. Beguni, G. Vilar Pereira, L.R. Pereira, I.C. Almeida, S. Roy, J. Lannes-Vieira, O.C. Moreira, Treatment with suboptimal dose of benznidazole mitigates immune response molecular pathways in mice with chronic Chagas cardiomyopathy, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11 (2021) 1–20, <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.692655>.
- [96] F. Torrico, J. Gascón, F. Barreira, B. Blum, I.C. Almeida, C. Alonso-Vega, T. Barboza, G. Bilbe, E. Correia, W. Garcia, L. Ortiz, E. Parrado, J.C. Ramirez, I. Ribeiro, N. Strub-Wourgaft, M. Vaillat, S. Sosa-Estani, R. Arteaga, A. de la Barra, J. Camacho-Borja, I. Martínez, J. Fernandes, L. García, D. Lozano, A. Palacios, A. Schijman, M.J. Pinazo, J. Pinto, G. Rojas, I. Esteveao, U. Ortega-Rodriguez, M.T. Mendes, E. Schuck, K. Hata, N. Maki, M. Asada, New regimens of benznidazole monotherapy and in combination with fosravuconazole for treatment of Chagas disease (BENDITA): a phase 2, double-blind, randomised trial, *Lancet Infect. Dis.* 21 (2021) 1129–1140, [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30844-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30844-6).
- [97] A.C.L. Leite, J.W.P. Espíndola, M.V. de Oliveira Cardoso, G.B. de Oliveira Filho, Privileged structures in the design of potential drug candidates for neglected diseases, *Curr. Med. Chem.* 26 (2019) 4323–4354, <https://doi.org/10.2174/0929867324666171023163752>.
- [98] P.A. Teixeira de Moraes Gomes, M. Veríssimo de Oliveira Cardoso, L.R. dos Santos, F. Amaro de Sousa, J.M. da Conceição, V. Gouveia de Melo Silva, D. Duarte, R. Pereira, R. Oliveira, F. Nogueira, L.C. Alves, F.A. Brayner, A.C. da Silva Santos, V. Régio Alves Pereira, A.C.Lina Leite, Dual parasitocidal activities of phthalimides: synthesis and biological profile against *Trypanosoma cruzi* and *Plasmodium falciparum*, *ChemMedChem* 15 (2020) 2164–2175, <https://doi.org/10.1002/cmdc.202000331>.
- [99] D.Rodney Rodrigues de Assis, A. Almeida Oliveira, S. Luiz Porto, R. Aparecida Nonato Rabelo, E. Burgarelli Lages, V. Corrêa Santos, M. Marques Milagre, S. Perdigão Fragoso, M. Martins Teixeira, R. Salgado Ferreira, C. Renato Machado, L. Antonio Miranda Ferreira, N. Lucio Speziali, H. Beraldo, F. Simão Machado, 4-Chlorophenylthioacetone-derived thiosemicarbazones as potent antitrypanosomal drug candidates: investigations on the mode of action, *Bioorg. Chem.* 113 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2021.105018>.
- [100] G. Álvarez, J. Varela, E. Cruces, M. Fernández, M. Gabay, S.M. Leal, P. Escobar, L. Sanabria, E. Serna, S. Torres, S.J.F. Thiel, G. Yaluff, N.I.V. De Bilbao, H. Cerecetto, M. González, Identification of a new amide containing thiazole as a drug candidate for treatment of chagas' disease, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (2015) 1398–1404, <https://doi.org/10.1128/AAC.03814-14>.
- [101] G. Bezerra de Oliveira Filho, M. Veríssimo de Oliveira Cardoso, A. Caroline da Silva Santos, T.A. Ramos dos Santos, A.C. Cristovão-Silva, L.G. Rubio, L. da Silva Maia Neto, P.G. Leite, F.S. Machado, L.C. Alves, F.A. Brayner, V.R. Alves Pereira, A. C. Lima Leite, Structural design, synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* profile of the second generation of 4-thiazolidinones chlorine derivatives, *Chem. Biol. Interact.* 345 (2021), <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2021.109514>.
- [102] M.C. Albarreda, M.A. Natale, A.M. De Rissio, M. Fernandez, A. Serjan, M. G. Alvarez, G. Cooley, H. Shen, R. Viotti, J. Bua, M.D. Castro Eiro, M. Nuñez, L. E. Fichera, B. Lococo, K. Scollo, R.L. Tarleton, S.A. Laucella, Distinct treatment outcomes of antiparasitic therapy in trypanosoma cruzi-infected children is associated with early changes in Cytokines, Chemokines, and T-Cell Phenotypes, *Front. Immunol.* 9 (2018) 1–15, <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01958>.
- [103] M.G. Alvarez, G.L. Bertocchi, G. Cooley, M.C. Albarreda, R. Viotti, D.E. Perez-Maziah, B. Lococo, M. Castro Eiro, S.A. Laucella, R.L. Tarleton, Treatment success in *Trypanosoma cruzi* infection is predicted by early changes in serially monitored parasite-specific T and B cell responses, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (2016) 1–15, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004657>.



Ana Catarina Cristovão-Silva has a degree in Biomedicine from the Federal University of Pernambuco (2012–2016) and a Master's degree in Biosciences and Biotechnology in Health from FioCruz-PE (2016–2018) with a concentration in the area of Basic Cellular and Molecular Biology applied to the study of drug action. Since scientific initiation, she has been working with compound testing for neglected diseases, focusing on Chagas disease. She is currently pursuing a PhD in Therapeutic Innovation (UFPE), developing a project that aims to combine computational methods and "in vitro" methods for the correct election of a drug candidate for Chagas disease.



Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro graduated in Biomedicine from the Federal University of Pernambuco (UFPE), has a master's degree in Sciences from the Aggeu Magalhães Institute (IAM) and a doctorate (2013) and post-doctorate (2015) in Therapeutic Innovation from UFPE. She is currently a professor at UFPE and at the postgraduate program in Therapeutic Innovation, from the same University. She is a collaborator of IAM and a member of their flow cytometry core unit. She has experience in the fields of Immunology and Parasitology and her research group is focused on the development of immunological biomarkers and vaccines for infectious and parasitic diseases.

ANEXO A – CEUA 102/2016



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: "AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA" protocolado sob nº 102/2016 pelo (a) pesquisador (a) Dra Valéria Pereira **Hernandes** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 10/02/2017. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 10 de fevereiro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (BALB/c)	375 (20-30 gr/ 60 dias/ machos)
TOTAL	375

We certify that project "AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA" (CEUA Protocol nº 102/2016) coordinated by **VALÉRIA PEREIRA HERNANDES** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on february, 10, 2017. In present version this project is licensed and valid until february 2021 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) February, 10, 2017

Sheila Andrade de Oliveira
 Drª Sheila Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheila Andrade de Oliveira
 Coordenadora da Comissão de Ética
 no Uso de Animais - CEUA
 Mat. SIAPE 1554975
 e-mail: sheila@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50 670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br