

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde

ANA CATARINA CRISTOVÃO SILVA

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA
DE UMA NOVA CLASSE DE COMPOSTOS TIAZOLIDINONICOS NA DOENÇA DE
CHAGAS**

Recife
2018

ANA CATARINA CRISTOVÃO SILVA

Investigação da atividade antiparasitária e imunomoduladora de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos na doença de Chagas

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para obtenção do grau de mestre em Ciências.

Orientadora:

Dra. Valéria Pereira Hernandez

Coorientadoras:

Dra. Andresa Pereira de Oliveira Mendes

Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Recife

2018

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- S586i Silva, Ana Catarina Cristovão.
Investigação da atividade antiparasitária e imunomoduladora de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos na doença de Chagas / Ana Catarina Cristovão Silva. - Recife: [s.n.], 2018.
89 p. : il., graf., tab., 30 cm.
- Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.
Orientadora: Valéria Pereira Hernandes.
Coorientadora: Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro e Andresa Pereira de Oliveira Mendes.
1. Doença de Chagas - quimioterapia. 2. Imunomodulação. 3. Trypanosoma cruzi. 4. Preparações Farmacêuticas. 5. Tripanossomicidas - uso terapêutico. 6. Tripanossomicidas - administração & dosagem. I. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz de. II. Mendes, Andresa Pereira de Oliveira. III. Título.

ANA CATARINA CRISTOVÃO SILVA

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE
UMA NOVA CLASSE DE COMPOSTOS TIAZOLIDINONICOS NA DOENÇA DE
CHAGAS

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Biociências e
Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu
Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, para
obtenção do grau de mestre em Ciências.

Aprovada em: 27/02/2018

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Valéria Pereira Hernandes

Depto. de Imunologia - Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dr^a. Silvia Maria Lucena Montenegro

Depto. de Imunologia - Instituto Aggeu Magalhães /FIOCRUZ-PE

Dr^a. Maíra Galdino da Rocha Pitta

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, pelo abraço revigorante sempre que eu chego cansada em casa. 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 minha orientadora, Valéria Pereira, pelo aprendizado, por me ajudar a crescer pessoal e profissionalmente. Estar no seu grupo de pesquisa é uma oportunidade excepcional.

As minha co-orientadoras, Carol e Andresa, pela paciência em me repassar seus conhecimentos, por terem tirado minhas dúvidas e me auxiliado de maneira excepcional sempre que podiam.

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 Intituto Aggeu Magalhães por fornecer a estrutura e os equipamentos necessários para o desenvolvimento do meu projeto e pela concessão da bolsa.

“Por vezes sentimos que aquilo que
fazemos não é senão uma gota de água
no mar, mas o mar seria menor se lhe
faltasse uma gota”
(Madre Teresa de Calcutá)

SILVA, Ana Catarina Cristovão. **Investigação da atividade antiparasitária e imunomoduladora de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos na doença de Chagas**. 2018. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

RESUMO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada que possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*. O tratamento é baseado no benzonidazol (Bzn), que é muito tóxico e mais efetivo na fase aguda da doença. Assim, o desafio no tratamento desta é a descoberta de fármacos mais eficazes. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi investigar a ação tripanocida e imunomoduladora de dezoito novos compostos tiazolidinônicos. Para avaliação *in silico*, foi feito *docking* molecular tendo como alvo a enzima cruzaina. Para a citotoxicidade, diferentes tipos celulares foram utilizados; a atividade tripanocida foi avaliada frente a epimastigotas e tripomastigotas; para a dosagem de óxido nítrico (ON) foram utilizados macrófagos; para investigar o perfil imunomodulatório e de morte celular, esplenócitos murinos e tripomastigotas, respectivamente, foram utilizados. Para adquirir os valores de CC₅₀ e IC₅₀, utilizou-se o *software* Prism 5.0 e para análise estatística foram empregados testes não paramétricos de Mann-Whitney (variabilidade entre grupos tratados) e de Wilcoxon (variabilidade entre grupos tratado e controle). Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. A série DR demonstrou maior afinidade *in silico* pela cruzaina que a TD. A maioria dos compostos foi menos tóxica em relação à droga de referência para aos 3 tipos celulares. Com relação a atividade tripanocida, os destaques em comparação ao Bzn frente a epimastigotas foram TD-03 (5,09 µM) e TD-06 (7,71 µM) e frente a tripomastigotas foram TD-01 (28,37 µM), TD-03 (15,34 µM), TD-06 (7,99 µM) e TD-09 (29,61 µM). Nenhum composto induziu a produção de ON. Houve produção de citocinas chaves para o desenvolvimento de resposta imune efetora e regulatória (TNF, IL-2, IL-6, IL-10 e IL-17). A concentração de 1x a IC₅₀ induziu apoptose na maioria dos compostos avaliados. O composto TD-06 possuiu interessante atividade antiparasitária, citotóxica e imunomoduladora, sendo um potencial candidato à fármaco para a doença.

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

SILVA, Ana Catarina Cristovão. **Antiparasitary and immunomodulatory activity investigation of new thiazolidinonical compounds in Chagas disease**. 2018. Dissertation (Master's Program in Biosciences and Biotechnology in Health) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2018.

ABSTRACT

Chagas disease is a neglected disease that has as its etiological agent *Trypanosoma cruzi*. The treatment is based on benznidazole (Bzn), which is very toxic and more effective in the acute phase of the disease. Thus, the challenge about the treatment of this disease is the discovery of more effective drugs. Thus, the objective of the study was to investigate the trypanocidal and immunomodulatory effects of eighteen new thiazolidinone compounds. For the *in silico* evaluation, it was done a molecular *docking* targeting the cruzaine enzyme. For cytotoxicity analysis, different cell types were used; trypanocidal activity was evaluated against epimastigotes and trypomastigotes; for the nitric oxide (NO) dosage, macrophages were used; to investigate the immunomodulatory and cell death profile, murine splenocytes and trypomastigotes, respectively, were used. In order to achieve the values of CC₅₀ and IC₅₀, the software Prism 5.0 was used and non-parametric tests of Mann-Whitney (variability between treated groups) and Wilcoxon (variability between treated and control groups) were used for statistical analysis. All conclusions were taken at the significance level of 5%. The DR series demonstrated higher *in silico* affinity for cruzaine than TD. Most of the compounds were less toxic than the reference drug for the 3 cell types. Regarding trypanocidal activity, the highlights in comparison to the Bzn against epimastigotes were TD-03 (5.09 µM) and TD-06 (7.71 µM) and against trypomastigotes were TD-01 (28.37 µM), TD-03 (15.34 µM), TD-06 (7.99 µM) and TD-09 (29.61 µM). No compound induced NO production. There was the production of key cytokines for the development of effector and regulatory immune response (TNF, IL-2, IL-6, IL-10 and IL-17). The concentration of 1x IC₅₀ induced apoptosis in most of the evaluated compounds. Compound TD-06 had interesting antiparasitic, cytotoxic and immunomodulatory activity, being a potential candidate for the drug for the disease.

Keywords: Chagas disease. Immunomodulation. *Trypanosoma cruzi*. Drugs

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenho esquemático das formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2 - Estruturas intracelulares de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
Figura 3 - Ciclo biológico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 4 - Radiografias de algumas das apresentações clínicas da doença de Chagas.....	23
Figura 5 - Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.....	29
Figura 6 - Síntese das tiossemicarbazonas e 4-tiazolinonas, reagentes e condições.....	37
Figura 7 - Estruturas e pesos moleculares de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).....	38
Figura 8 - As interações intermoleculares que ocorrem nas melhores soluções de <i>docking</i> (TD-06 e DR-06) de cada série e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1** - Atividade tripanocida dos compostos TD-03 e TD-06 frente a epimastigotas (Dm28) de *Trypanosoma cruzi*.....51
- Gráfico 2** - Atividade tripanocida dos compostos TD-01, TD-03, TD-06 e TD-09 frente a tripomastigotas (cepa Y) de *Trypanosoma cruzi*.....53
- Gráfico 3** - Indução da produção das citocinas IFN- γ , IL-2, TNF e IL-6 pelos diferentes compostos no tempo de 6 dias.....56
- Gráfico 4** - Indução da produção da citocina IL-10 pelos diferentes compostos no tempo de 6 dias.....58
- Gráfico 5** - Indução da produção da citocina IL-17 pelos diferentes compostos no tempo de 6 dias.....58
- Gráfico 6** - Indução de apoptose inicial frente ao tratamento com 1xIC₅₀ e 2xIC₅₀ dos compostos testados.....59
- Gráfico 7** - Indução de apoptose tardia frente ao tratamento com 1xIC₅₀ e 2xIC₅₀ dos compostos testados.....60
- Gráfico 8** - Indução de necrose frente ao tratamento com 1xIC₅₀ e 2xIC₅₀ dos compostos testados.....61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Anormalidades de esôfago e cólon na Doença de Chagas baseadas no raio-x.....	23
Quadro 2 - Esquema terapêutico da doença de Chagas.....	30
Quadro 3 - Questões que permanecem sem respostas na doença de Chagas.....	31
Quadro 4 - Critérios aceitáveis e ideais, segundo o DNDi, para o tratamento da doença de Chagas.....	32

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Substituintes e pesos moleculares das tiossemicarbazonas e 4-tiazolinonas.....**37**
- Tabela 2** - Valores de *score* (ChemPLP) para as soluções de *docking* dos compostos TD e DR em seus respectivos isômeros E e Z.....**46**
- Tabela 3** - Atividade citotóxica – concentração atóxica em µg/ml e µM – frente a esplenócitos murinos de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).....**49**
- Tabela 4** - Atividade citotóxica em µg/ml e µM frente a hepatócitos (HepG2) de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).....**49**
- Tabela 5** - Atividade citotóxica – CC₅₀ em µg/ml e µM – frente a macrófagos (J774) de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).....**50**
- Tabela 6** - Atividade tripanocida – IC₅₀ em µg/ml e µM – frente a epimastigotas de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).....**51**
- Tabela 7** - Atividade tripanocida – IC₅₀ em µg/ml e µM – frente a tripomastigotas (cepa Y) de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).....**52**
- Tabela 8** - Índice de seletividade (ISe) para a forma epimastigota (Dm28) de *Trypanosoma cruzi* de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).....**54**

Tabela 9 - Índice de seletividade (ISe) para a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

.....**54**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD	7-aminoactinomicina D
ADME	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AV	Anexina-V
BENEFIT	<i>Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis</i>
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
ConA	Concanavalina A
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTU	<i>Discreat Type Unit</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IC ₅₀	Concentração inibitória para 50% dos parasitos
IFN- γ	Interferon-gama
IGM	Instituto Gonçalo Moniz
IL	Interleucina
ISe	Índice de seletividade
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LPS	Lipopolissacarídeo
ND	Não Determinado
NR	Não Realizado
NK	<i>Natural killer</i>
NTR	Nitrorredutase do tipo 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Th	<i>T helper</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TPP	<i>Target Product Profile</i>
Tc (I, II, V, VI)	Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	Aspectos gerais de <i>T. cruzi</i> e da doença de Chagas	16
2.2	Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas	21
2.3	Formas clínicas da doença de Chagas	22
2.4	Aspectos imunológicos da doença de Chagas	24
2.4.1	Infecção aguda	24
2.4.2	Infecção crônica	26
2.5	Tratamento da doença de Chagas	28
2.6	Desafio no estudo de drogas eficazes para a doença de Chagas	31
2.7	Drogas sintéticas e novas abordagens terapêuticas para a doença de Chagas	33
3	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivo geral	36
3.2	Objetivos específicos	36
4	PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS	37
4.1	Compostos	37
4.2	<i>Docking</i> molecular	40
4.3	Animais	40
4.4	Obtenção de esplenócitos murinos	40
4.5	Avaliação da atividade citotóxica	41
4.5.1	Esplenócitos murinos	41
4.5.2	Células de linhagem hepática HepG2	41
4.5.3	Células de linhagem macrofágica J774	42
4.6	Avaliação da atividade tripanocida	42
4.6.1	Epimastigotas	42
4.6.2	Tripomastigotas	43
4.7	Dosagem de óxido nítrico	43
4.8	Obtenção de sobrenadante de cultura para quantificação da produção de citocinas	44

4.9 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo.....	44
4.10 Avaliação do perfil de morte celular por citometria de fluxo.....	45
4.11 Análise estatística.....	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 <i>Docking</i> molecular.....	46
5.2 Avaliação da atividade citotóxica.....	48
5.2.1 Esplenócitos murinos.....	48
5.2.2 Células de linhagem hepática HepG2.....	49
5.2.3 Células de linhagem macrófaga J774.....	50
5.3 Avaliação da atividade tripanocida.....	50
5.3.1 Epimastigotas.....	50
5.3.2 Tripomastigotas.....	52
5.4 Índice de seletividade.....	54
5.5 Dosagem de óxido nítrico.....	55
5.6 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo.....	55
5.7 Avaliação do perfil de morte celular por citometria de fluxo.....	59
5.7.1 Apoptose inicial.....	59
5.7.2 Apoptose tardia.....	59
5.7.3 Necrose.....	60
6 DISCUSSÃO.....	62
7 CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69
ANEXO A – CEUA 0266/05	88
ANEXO B – CEUA 102/2016	89

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é considerada negligenciada e 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. O tratamento utilizado atualmente é baseado em duas drogas, o benzonidazol e nifurtimox, porém a eficácia muda de acordo com a fase da doença, além de possuírem alta toxicidade. 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.

Com o desenvolvimento de ferramentas de biologia celular e molecular, cada vez mais avançados, foi possível estudar o parasito e encontrar alvos importantes de seu ciclo de vida. A partir desses achados, tornou-se factível desenhar compostos sintéticos por ferramentas computacionais, tendo como alvos importantes componentes do ciclo de vida de *T. cruzi*. Considerando que a eficácia do tratamento está intimamente associada à resposta imune do indivíduo, o presente projeto visou elucidar por abordagens *in silico* e *in vitro*, os mecanismos celulares e moleculares de compostos sintéticos para a doença de Chagas. Para as avaliações *in silico* foi utilizada a enzima cruzaina de *T. cruzi*. Em paralelo, diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (epimastigotas e tripomastigotas), células de cultura primária e do sistema imune (esplenócitos murinos), de linhagens (hepática e macrofágica) foram consideradas nas abordagens *in vitro*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

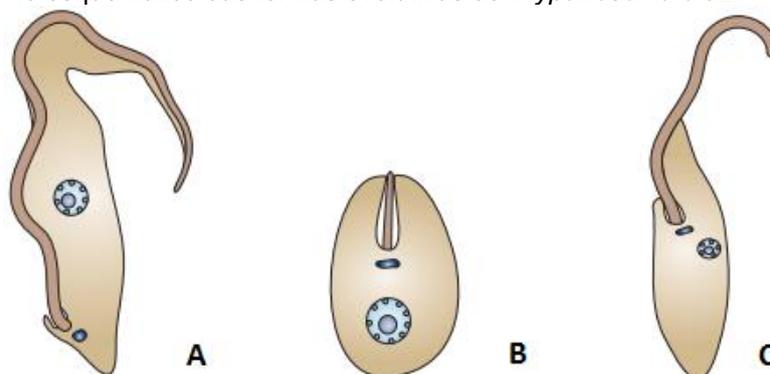
2.1 Aspectos gerais de *T. cruzi* e da doença de Chagas

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 para se entender sobre ela (ÁLVAREZ et al., 2014; BERN, 2015; PEREIRA; NAVARRO, 2013).

Há cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo com a doença, principalmente distribuídas entre os 21 países da América Latina. O Brasil contribui com mais de 1 milhão desses casos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2015). Com relação ao cenário epidemiológico no Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2018), no período de 2007 a 2016, foram confirmados casos da doença de Chagas aguda na maior parte dos estados, com média anual de 200 casos. Cerca de 95% desses casos foram registrados na região Norte, principalmente no Pará onde estão 85% desses casos. Em relação às principais formas prováveis de transmissão no país, a maior parte (69%) foi atribuída à transmissão oral (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2015). Apesar da não existência de dados sistemáticos relativos à prevalência da doença, em estudos recentes a estimativa da prevalência variou de 1,0 a 2,4% da população, o que equivale a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi* no país. Isso se reflete na alta mortalidade pela doença no Brasil, pois ela é uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias. Já no estado de Pernambuco, os municípios que notificaram casos da doença de Chagas aguda nesse período foram: Ibimirim, Pombos, Riacho das Almas, Salgueiro e Vertentes.

O ciclo de *T. cruzi* é constituído por três formas evolutivas (figura 1) que se diferenciam através da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e a posição do flagelo (TEIXEIRA et al., 2011). 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 1 - Desenho esquemático das formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*.



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

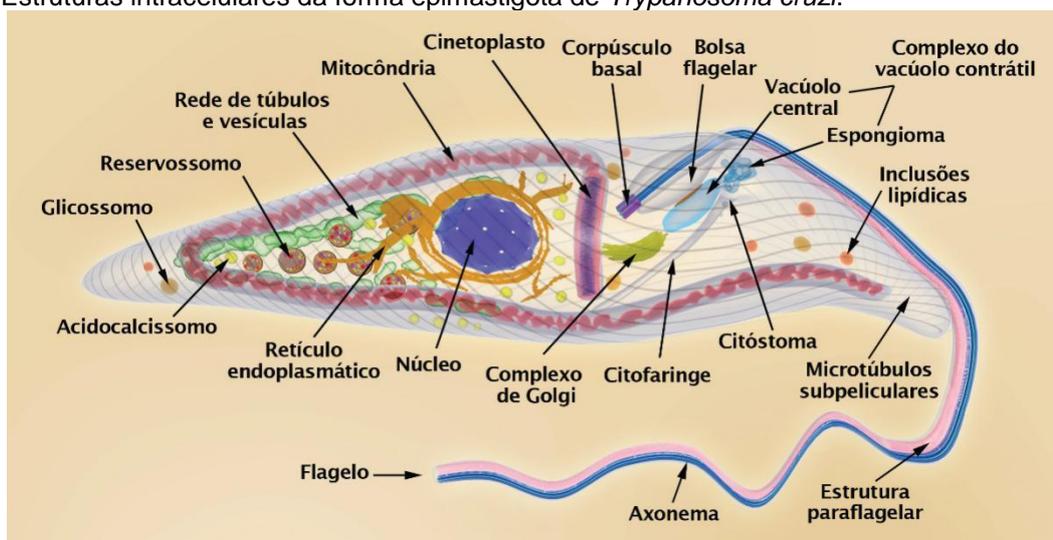
Legenda: A – Epimastigota, B – Amastigota, C – Tripomastigota.

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).

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). 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; ATTIAS; RODRIGUES, 2009). 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, 2014; LANGOUSIS; HILL, 2014).

Outras organelas importantes são os acidocalcissomos, ricos em cálcio, fósforo e outros íons, que participam da manutenção de pH e osmorregulação, (DOCAMPO; MORENO, 2011) e os glicossomos que armazenam enzimas da via glicolítica (MICHELS et al., 2006) (figura 2).

Figura 2 - Estruturas intracelulares da forma epimastigota de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Teixeira et al. (2011).

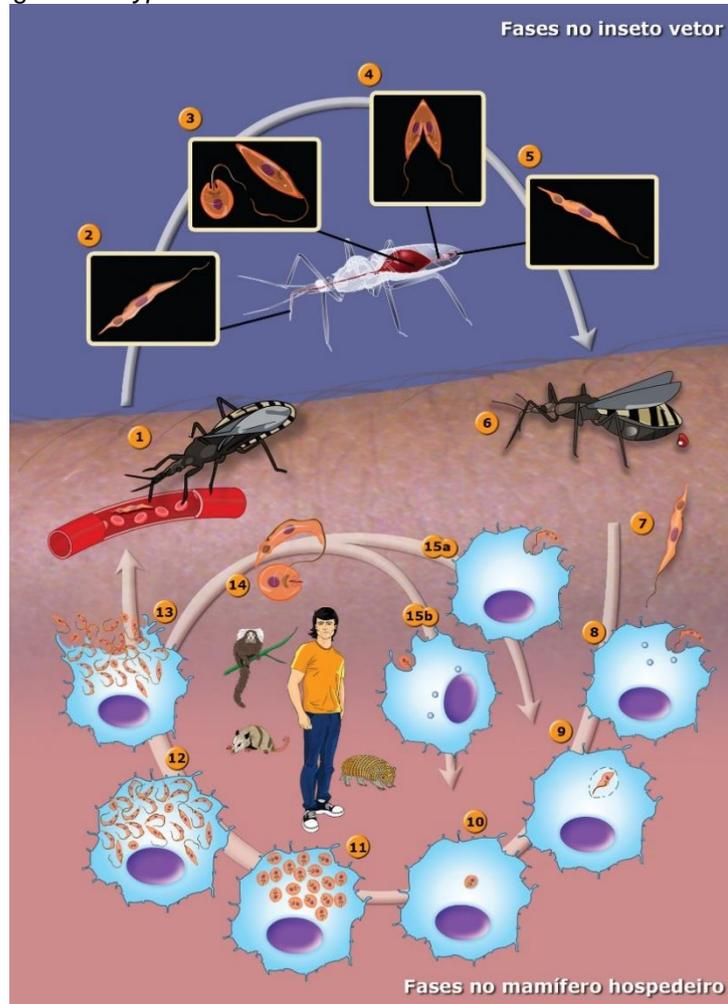
O ciclo evolutivo de *T. cruzi* (figura 3) se inicia comumente quando um inseto vetor faz o repasto sanguíneo em um animal ou humano infectado, ingerindo a forma tripomastigota sanguínea. No estômago do vetor, essa forma evolutiva se diferencia em epimastigotas e em alguns esferomastigotas e são digeridas.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

Ao picar o mamífero, o inseto na maioria das vezes urina e defeca, depositando a forma infectiva. Ao coçar o local da picada, o parasito pode entrar no hospedeiro através da lesão feita, ou quando tem contato com a mucosa. As formas infectivas entram na corrente sanguínea e podem invadir diferentes células nucleadas como os macrófagos. Após a fagocitose, forma-se o vacúolo parasitóforo, onde em seu interior o tripomastigota se diferencia em amastigota e há a lise da membrana do vacúolo. No citoplasma, amastigotas se multiplicam por seguidas divisões binárias.

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. Nem todas as formas amastigotas podem se diferenciar antes do rompimento da célula, o que leva ao aparecimento de diferentes formas no meio externo. Ainda no meio externo, tripomastigotas e amastigotas podem vir a infectar

outras células. O ciclo se reinicia quando um inseto vetor se alimenta do sangue do hospedeiro infectado.

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*.

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

A transmissão da doença de Chagas se dá, primariamente, 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).

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, 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). No entanto, a transmissão vetorial por *T. infestans* foi 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).

Tem crescido na região Amazônica a transmissão por via oral, que causa surtos recentes da doença (PINTO et al., 2008; SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012; SOUZA-LIMA et al., 2013). 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).

Com relação ao cenário mundial, algumas vias de transmissão ganharam importância 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): 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* do sangue dos prováveis doadores para que diminua o risco de transmissão da doença por essas vias.

2.2 Diagnóstico laboratorial da doença de Chagas

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2002), o diagnóstico na fase aguda da doença de Chagas se baseia, principalmente, na detecção do parasito em sua forma tripomastigota por exame direto do sangue periférico do paciente.

Já durante a fase crônica da doença, devido à escassez de parasitos no sangue, faz-se necessário outros métodos diagnósticos, como a detecção de anticorpos anti-imunoglobulina G contra *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 (DIAS, 2015).

Com relação a utilização de Reação em Cadeira 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).

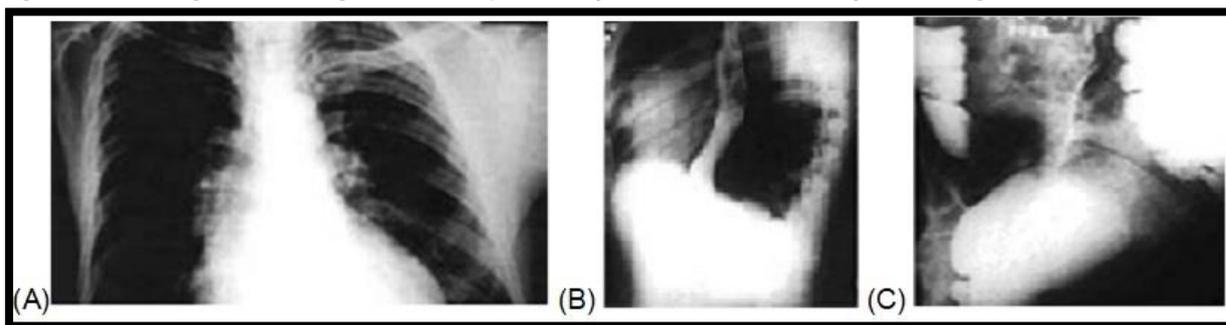
2.3 Formas clínicas da doença de Chagas

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 (2002), 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 4) (PRESTI et al., 2015).

Figura 4 - 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.

Pacientes 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).

Pessoas com a forma digestiva têm 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., 2011).

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 inflamação miocárdica, podendo levar ao aumento do coração (megalocardia), junto com miocitólise e fibrose (MACHADO et al., 2013).

Existem duas vertentes de pensamentos para patogênese chagásica crônica (GIRONÈS; FRESNO, 2003; TARLETON; ZHANG, 1999). A primeira traz a ideia de que o *T. cruzi* induz uma resposta do sistema imune aos tecidos normais do

hospedeiro e isso é independente de sua presença no tecido, ou seja, induz uma autoimunidade (BONNEY; ENGMAN, 2015; ENGMAN; LEON, 2002; 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.

2.4 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).

2.4.1 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 IL-4 (HIYAMA et al., 2001). Estudos em modelos experimentais agudos da doença mostraram o papel de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ , TNF (*Tumor necrosis factor*, Fator de Necrose Tumoral) 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 têm papel dual de acordo com o curso da doença (FERREIRA et al., 2014; PAPATHANASIOU et al., 2015).

A atuação da resposta imune inata tem importante papel no combate inicial ao parasito. Estudos trazem 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 (MACHADO et al., 2012). Moléculas de *T. cruzi*, como o glicosilfosfatidilinositol e mucinas incitam a síntese de IL-12 e TNF por macrófagos. O parasito também expressa a enzima cruzaina, a qual ajuda na maturação de células dendríticas (COELHO et al., 2002; SCHMITZ et al., 2009). O aumento da produção de IL-12 induzida pelo *T. cruzi* interfere 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 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 controlando a divisão intracelular do parasito e eliminá-lo (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 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).

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 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 sistema imune do hospedeiro (MAGALHÃES et al., 2015; NAGAJYOTHI et al., 2012; RODRIGUES et al., 2010).

2.4.2 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, 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., 2013).

Duas das principais citocinas do perfil pró-inflamatório, TNF 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 (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 conseqüentemente podem levar a redução dos danos teciduais (GOMES et al., 2002; 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, 2011^a 2011^b, 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. (2013) 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 recente 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).

Não se sabe o que leva a um aumento do perfil anti-inflamatório observado na forma indeterminada em relação a um 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; SCWARTZ; YANG, 2012; NOGUEIRA et al., 2015; PISSETI et al., 2013).

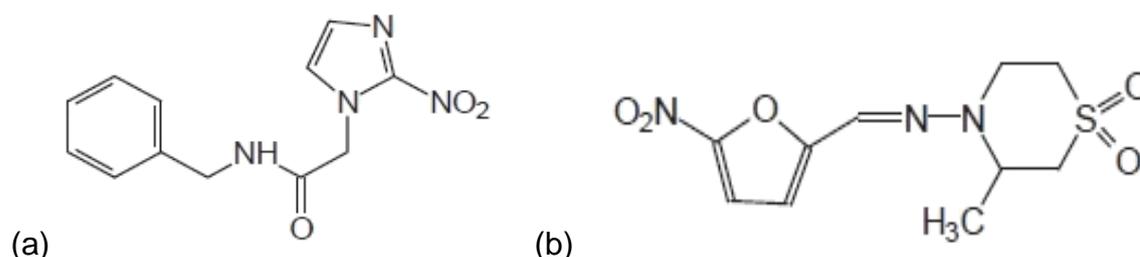
Devido a essa gama de perfis imunológicos envolvidos na patologia da doença, existe a importância de se investigar de que maneira um possível novo tratamento pode agir no sistema imunológico, auxiliando a combater o desenvolvimento da doença.

2.5 Tratamento da doença de Chagas

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; CASTRO, 2002).

O tratamento atualmente é baseado em duas drogas (figura 5): 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).

Figura 5 - Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas.



Fonte: Bosquesi et al., 2008.

Legenda : (a) Benznidazol 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 benznidazol. Nenhuma droga foi aprovada nos últimos 40 anos, desde o descobrimento do benznidazol e do nifurtimox, para o tratamento da doença (BELLERA et al., 2015).

Segundo o Drugs for Neglected Diseases Initiative (2015), o tratamento atual possui problemas como longa duração (30-60 dias), toxicidade dose-dependente, baixa taxa de adesão e ausência de formulação pediátrica. Recentemente foi lançada, com o apoio do *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi, Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas), 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 (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).

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).

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 Benznidazol para Interrupção da Tripanossomíase), buscava verificar a eficácia do tratamento com benznidazol 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, mas, apesar de diminuir da detecção parasitária no soro, não foi verificada a diminuição da cardiopatia nos pacientes tratados (MORILLO et al., 2015).

2.6 Desafio no estudo de drogas eficazes 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 3):

Quadro 3 - 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 Drugs for Neglected Diseases Initiative (2016) traz critérios considerados aceitáveis e ideais para o tratamento da doença, expostos no quadro 4.

Quadro 4 - 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 nitrofurán e a nitroimidazol
Contraindicações	Gravidez/Lactação	Nenhuma
Precauções	Não genotóxico, com potencial pró-arrítmico insignificante	Sem genotoxicidade; sem teratogenicidade; sem efeito inotrópico negativo; potencial pró-arrítmico significativo
Interações	Nenhuma interação clinicamente significativa com medicamentos anti-hipertensivos, antiarrítmico 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.

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

2.7 Drogas sintéticas e novas abordagens terapêuticas para a 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 evoluído sensivelmente nos últimos anos (BUCKNER; NAVABI, 2010).

Dentro dos ensaios necessários para se chegar a uma nova quimioterapia, a importância de estudos *in silico* 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.

Para que os estudos avancem, é importante que se busque alvos moleculares específicos para o parasito (FIELD et al., 2017; GILBERT, 2013). 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 (DIAS et al., 2009). Alvos importantes de *T. cruzi* são principalmente enzimas como trans-sialidase, nitrorredutase tipo 1 (NTR) e a cruzaina (BALAÑA-FOUCE et al. 2014; BERMUDEZ et al., 2016; MILLER; ROITBERG, 2013; SAN FRANCISCO et al., 2017).

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 sialilímiméticos, 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).

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 *Discreet Type Unit* (DTU). 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).

A cruzaina, também chamada cruzipaina, 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) tendo envolvimento também no escape ao sistema imune do hospedeiro, representando um alvo molecular para o desenho de novos fármacos anti-parasitários (HARTH et al., 1993; MCKERROW; ENGEL; CAFFREY, 1999; SILES et al., 2006). O inibidor mais conhecido e potente dessa enzima é o K777, em fase de entrar em estudos clínicos (DUSHACK, 2016; MCKERROW et al., 2009).

Testes *in vitro* realizados por nosso grupo de pesquisa com derivados aril-tiossemicarbazonas e aril-4-tiazolinonas, sintetizados no Departamento de Ciências Farmacêuticas (UFPE), revelaram efetiva atividade antichagásica (DONNICI et al., 2009) mesmo em escala nanomolar que foi confirmada através da alta afinidade destas moléculas pela cruzaina nos estudos de *docking* (CARDOSO et al., 2014; HERNANDES et al., 2010; MOREIRA et al., 2009).

Derivados de tiossemicarbazonas e 4-tiazolinonas tem sido o objeto de estudos biológicos, devido à sua interessante farmacologia incluindo antiviral, anti-inflamatória, antiprotozoária e propriedades antitumorais (ESPÍNDOLA et al., 2015; GUPTA et al., 2016; HERNANDES et al., 2010; LEITE et al., 2007; KOBYLINSKA et al., 2016;

MOREIRA et al., 2012; TENÓRIO et al., 2005). 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.

As hidrazonas derivadas da 4-tiazolidina foram descobertas recentemente após estudos extensivos da relação entre sua estrutura química e a atividade antiparasitária frente a *T. cruzi*, os quais permitiram identificar a natureza farmacofórica de suas subunidades (MOREIRA et al., 2014). Baseado nisto, foi planejado uma série inédita de compostos tiazolinônicos, divididos em duas séries (TD e DR) cada uma com 9 compostos, que possuem como principal característica estrutural a presença de um anel fenílico localizado na posição C-5 do anel heterocíclico. Neste anel fenílico em C-5, foram anexados substituintes químicos com diferentes características físico-químicas e estruturais.

Sendo assim, os compostos deste trabalho foram investigados *in silico* com relação as suas afinidades pela enzima cruzaina. Além disso, foram avaliados *in vitro* quanto à ação anti-*T. cruzi* em ensaios sobre formas epimastigotas e tripomastigotas; quanto a sua citotoxicidade em esplenócitos murinos, além de células de linhagem de macrófagos e hepatócitos; quanto a capacidade imunomoduladora dos compostos e com relação ao perfil de morte celular induzido por eles.

Os testes do nosso trabalho nos permitem iniciar a elucidação para adequada eleição de protótipos a fármacos tripanocidas.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar os mecanismos celulares e moleculares de novos compostos tiazolidinônicos, candidatos a fármacos tripanocidas.

3.2 Objetivos específicos

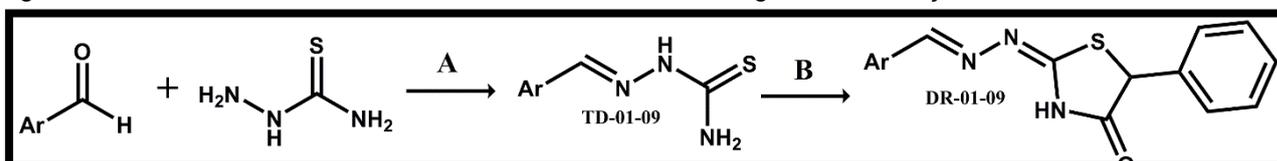
- a) Avaliar *in silico* a afinidade dos compostos pela enzima cruzaina e descrever as razões intermoleculares que justifiquem as diferenças de afinidade entre os compostos;
- b) Avaliar a atividade citotóxica em esplenócitos murinos e linhagens celulares hepática (HepG2) e macrófaga (J774);
- c) Determinar *in vitro* a atividade tripanocida das substâncias avaliadas sobre formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*;
- d) Avaliar o efeito *in vitro* das substâncias sintéticas na produção de ON em linhagem de macrófagos J774;
- e) Quantificar a produção das citocinas IFN- γ , TNF, IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17A nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas após tratamento *in vitro* com as substâncias sintéticas;
- f) Avaliar por citometria de fluxo a participação dos compostos na indução de morte celular.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 Compostos

Os dezoito compostos testados (TD-01 a 09 e DR-01 a 09) foram sintetizados em colaboração com o Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Instituto Gonçalo Moniz (IGM/FIOCRUZ-Bahia) e com o Laboratório de Síntese de Fármacos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. A rota sintética dos compostos está descrita na figura 6 e os substituintes de cada composto estão descritos na tabela 1.

Figura 6 - Síntese das tiossemicarbazonas e 4-tiazolinonas, reagentes e condições.



Fonte: MOREIRA, D. R. M. Estrutura Compostos [mensagem pessoal]. Mensagem recebida por <catarinacristovao@outlook.com> em 27 mar. 2017.

Legenda: A) Diferentes aldeídos aromáticos, tiossemicarbazida, etanol, H₂SO₄, ultrassom, 1-2h; B) Tiossemicarbazonas (TD-01-09), 2-cloro-2-fenilacetato de etila, etanol, acetato de sódio, agitação magnética, refluxo, 14-20h.

Tabela 1 - Substituintes e pesos moleculares das tiossemicarbazonas e 4-tiazolinonas.

Código	Ar	Código	Ar
TD-01	4-(mofolinil)-fenil	DR-01	4-(mofolinil)-fenil
TD-02	3,4-(dimetoxi)-fenil	DR-02	3,4-(dimetoxi)-fenil
TD-03	4-(<i>t</i> -butil)-fenil	DR-03	4-(<i>t</i> -butil)-fenil
TD-04	4-pridinil	DR-04	4-pridinil
TD-05	4-(nitro)-fenil	DR-05	4-(nitro)-fenil
TD-06	4-(fenil)-fenil	DR-06	4-(fenil)-fenil
TD-07	3,4-(hidroxi)-fenil	DR-07	3,4-(hidroxi)-fenil
TD-08	3-(metoxi)-4-(hidroxi)- fenil	DR-08	3-(metoxi)-4-(hidroxi)- fenil
TD-09	3,4-metilenodioxo-fenil	DR-09	3,4-metilenodioxo-fenil

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Suas estruturas e pesos moleculares estão expostos na figura 7. Os compostos foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) e estocados a -20°C. Para os ensaios, cada composto foi diluído na concentração apropriada utilizando-se o meio de cultura adequado.

Figura 7 - Estruturas e pesos moleculares de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

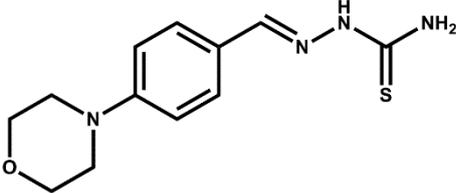
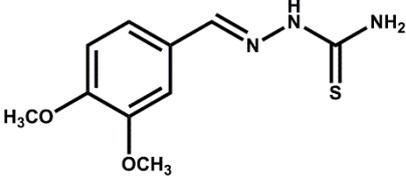
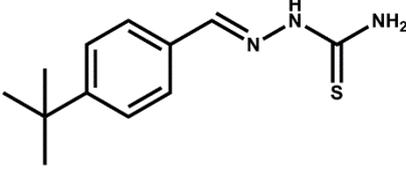
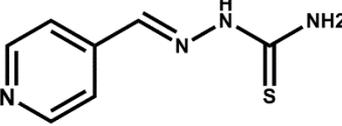
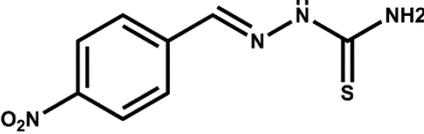
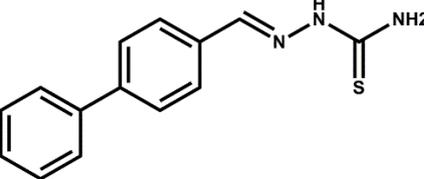
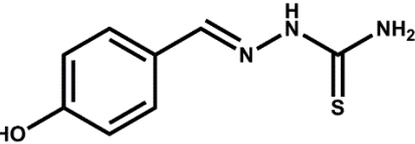
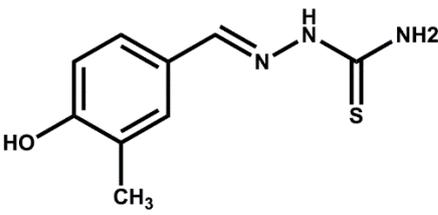
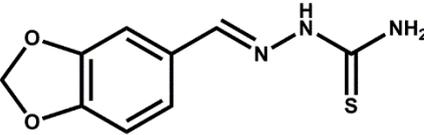
Código	Estrutura	Peso Molecular
TD-01		264,35
TD-02		239,29
TD-03		235,35
TD-04		180,23
TD-05		224,24
TD-06		255,34
TD-07		195,24
TD-08		209,27
TD-09		223,25

Figura 7 - Estruturas e pesos moleculares de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

(continuação)

DR-01		382,48
DR-02		357,43
DR-03		353,48
DR-04		298,36
DR-05		342,37
DR-06		373,47
DR-07		313,38
DR-08		327,40
DR-09		341,38

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

4.2 *Docking* molecular

As estruturas de todos os compostos foram desenhadas utilizando 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 a enzima cruzaina do parasito *T. cruzi* como alvo biológico (PDB: 3IUT, <http://www.rcsb.org>). O sítio ativo foi definido como todos os átomos que estão dentro do raio de 6 Å a partir do ligante co-cristalizado (KB2). O programa GOLD 5.2 (Cambridge Crystallographic Data Centre, UK) foi utilizado para realizar os cálculos de *docking* molecular, utilizando a função de pontuação ChemPLP. Para levar em consideração os graus de liberdade do receptor, com o intuito de simular melhor o ajuste induzido, os seguintes aminoácidos foram tratados como flexíveis, utilizando a biblioteca de confórmeros: CYS25, TRP26, ASP60, SER64, LEU67, MET68, ASN70, MET160, ASP161 e LYS162. Posteriormente, o programa BINANA (DURRANT & MCCAMMON, 2011) foi utilizado para analisar as interações intermoleculares das soluções de *docking*, utilizando os parâmetros padrão. As figuras foram geradas utilizando o programa Pymol (DELANO, 2002).

4.3 Animais

Para o ensaio de citotoxicidade (item 3.4.1) foram utilizados camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c, machos, com 6 - 8 semanas de idade, pesando 20 ± 2 g considerando-se CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) 0266/05 (anexo A). O protocolo de experimentação animal utilizado para os ensaios de imunomodulação (itens 3.7 e 3.8), foi avaliado com registro 102/2016 (anexo B).

4.4 Obtenção de esplenócitos murinos

Após sacrifício do animal em câmara de CO₂, removeu-se o baço de cada camundongo em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) +1% de antibiótico. 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 Falcon contendo aproximadamente 10ml de meio RPMI+1% de antibiótico por baço, centrifugadas 400 x g durante cinco minutos. O sedimento (contendo as células) foi ressuspenso 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.

4.5 Avaliação da atividade citotóxica

4.5.1 Esplenócitos murinos

Células esplênicas (6×10^6 células/ml) de camundongos BALB/c foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI+1% de antibiótico+10% de SFB (completo). Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em diferentes concentrações (3,13; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 $\mu\text{g/ml}$) e com timidina tritiada (timidina- H^3 , 1 $\mu\text{Ci/poço}$) durante 24h em estufa de CO_2 a 37°C . Para o controle positivo utilizou-se células tratadas com saponina (0,05%) e sem tratamento, todos com timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci/poço}$) associada. Cada droga foi testada em triplicata. Após 24h de incubação, coletou-se as células em papel de fibra de vidro e, posteriormente, determinou-se a captação de timidina tritiada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados. As concentrações atóxicas foram definidas como aquelas que causaram uma redução na incorporação com timidina tritiada abaixo de 30% em relação ao controle sem tratamento (apenas células e meio de cultura, sem as substâncias testadas).

4.5.2 Células de linhagem hepática HepG2

Células HepG2 mantidas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) completo a 37°C e 5% de CO_2 foram plaqueadas em placas de 96 poços ($0,7 \times 10^5$ células/ml) por 24h para que aderissem. Após esse período, adicionou-se os compostos (3,9; 7,8; 15,6; 31,2; 62,5; 125; 250 e 500 $\mu\text{g/ml}$) e as placas foram reincubadas por mais 48h. Quatro

horas antes de completar as 72h de incubação, 20µL da solução de Alamar Blue (solução de resazurina a 0,312 mg/mL) foi adicionada aos poços e novamente incubada sob as mesmas condições descritas anteriormente. Cada composto foi testado em duplicata. Utilizou-se como controle positivo o benzonidazol; como controle da toxicidade do veículo dos compostos, o DMSO a 0,1%; e como controle negativo, poços sem tratamento. Passado o período total de incubação, fez-se a leitura da absorbância a 570 nm e 600 nm em leitor de placa (Multiskan FC Microplate Photometer, ThermoFisher Scientific). A partir dos valores de inibição, obteve-se a CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células) de cada composto.

4.5.3 Células de linhagem macrófaga J774

Macrófagos da linhagem J774 (10^5 células/ml) foram semeados em placas de 96 poços contendo meio DMEM completo em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C por 24h. Posteriormente, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 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 CC_{50} .

4.6 Avaliação da atividade tripanocida

4.6.1 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).

4.6.2 Tripomastigotas

As formas tripomastigotas (cepa Y) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* (10⁷ parasitos) da linhagem de células Vero, após estas obterem confluência em cultura. Para determinar o efeito antiproliferativo para formas tripomastigotas da cepa Y (4x10⁶ 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.

4.7 Dosagem de óxido nítrico

Linhagem de macrófago Raw 264.7 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 (1, 5, 10, 25, 50, 100 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, transferiu-se 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. Determinou-se o percentual

de produção de ON de cada composto comparando-se os resultados das absorvâncias com os das culturas não tratadas com os compostos.

4.8 Obtenção de sobrenadante de cultura para quantificação da produção de citocinas

Suspensões de células esplênicas foram depositadas em placas de 24 poços (10^6 células/ml), em duplicata. As células foram tratadas com 1x e 2x a IC_{50} 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.

4.9 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

As citocinas TNF, IFN- γ , 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- 0,9 pg/ml; IFN- γ - 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).

4.10 Avaliação do perfil de morte celular por citometria de fluxo

Tripomastigotas (4×10^6 parasitos/ml) foram ressuspensos em meio RPMI e não tratados ou tratados com 1x e 2xIC₅₀ dos compostos, durante 24h a 37°C em 5% de CO₂. Parasitos 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 FL2-H para 7-AAD. A droga de referência foi o benzonidazol. Os dados foram analisados utilizando o software FlowJo® (Tree Star Inc ©, Ashland, EUA) e expressos como a porcentagem de parasitos em cada quadrante (não coradas, coradas apenas com 7-AAD, coradas apenas com AV ou coradas com ambos os marcadores) em comparação com o número total de células analisadas.

4.11 Análise estatística

A análise estatística foi realizada empregando-se testes não paramétricos. Foi feito teste de regressão linear simples para obtenção da CC₅₀ e da IC₅₀. A análise para medir a variabilidade entre o grupo tratado foi o teste Wilcoxon e entre grupos tratado e controle foi o teste Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% e todas as análises foram feitas no *software* GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS

5.1 *Docking* molecular

Ao observar os valores de *score* (ChemPLP) das soluções de *docking* dos compostos TD e DR (tabela 3), observa-se que os compostos DR possuem uma maior afinidade predita pelo sítio ativo da enzima cruzaina quando comparado com suas respectivas contrapartes TD. A diferença de *score* entre a melhor solução de um composto DR e sua contraparte varia entre 11,51 (DR-01 e TD-01) e 21,28 (DR-08 e TD-08).

Tabela 2 - Valores de *score* (ChemPLP) para as soluções de *docking* dos compostos TD e DR em seus respectivos isômeros E e Z.

Composto	E	Z	Composto	E	Z	DR(Z)-TD(E)
TD-01	47,18	45,58	DR-01	53,74	58,69	11,51
TD-02	42,94	41,25	DR-02	53,75	57,39	14,45
TD-03	46,17	46,19	DR-03	58,7	63,75	17,58
TD-04	33,34	32,42	DR-04	50,23	53,26	19,92
TD-05	38,72	37,19	DR-05	53,84	54,87	16,15
TD-06	54,2	52,93	DR-06	60,41	66,57	12,37
TD-07	36,55	35,91	DR-07	55,22	56,98	20,43
TD-08	38,45	37,9	DR-08	56,51	59,73	21,28
TD-09	38,41	36,81	DR-09	52,55	56,89	18,48

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Além disto, outro ponto interessante que pode ser observado nos valores de *score* das soluções de *docking* é que parece haver uma pequena preferência do sítio ativo da enzima cruzaina por diferentes isômeros dependendo da série (TD ou DR) do composto. As soluções de *docking* obtidas para as conformações com o isômero E para os compostos TD apresentaram valores de *score* ligeiramente mais elevados (melhores) quando comparados com as conformações obtidas com o isômero Z para estes mesmos compostos.

Esta diferença de *score* entre as soluções de *docking* obtidas para as soluções DR em relação aos compostos TD se deve, aparentemente, ao volume maior do chassi molecular dos compostos DR, cuja diferença em relação aos compostos TDs consiste na formação do anel heterocíclico e adição de uma ligação dupla com um átomo de oxigênio e um grupo fenil, nas posições C-4 e C-5 respectivamente deste

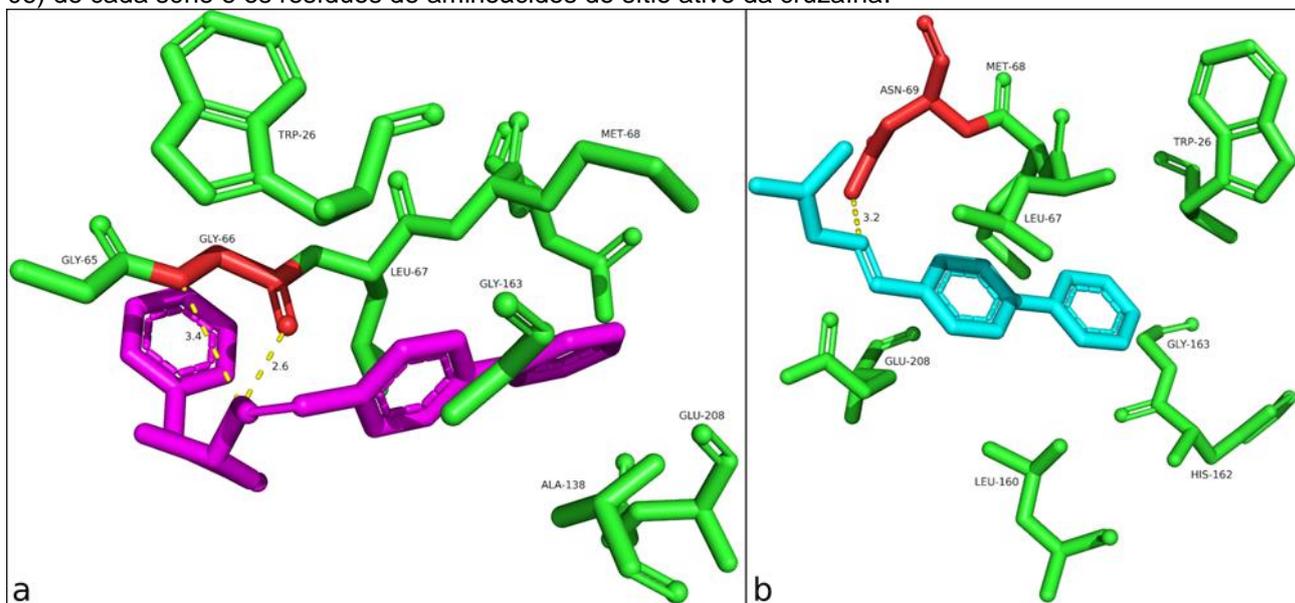
anel heterocíclico, aumentando o número de interações intermoleculares que este composto pode realizar. Por exemplo, ao analisar somente os isômeros E dos compostos TD e DR, apenas os compostos DR interagem com os resíduos de aminoácidos GLY23, CYS25, SER64, GLY65 e GLY66. Adicionalmente, ao analisar apenas os isômeros Z destes mesmos compostos, apenas os compostos DR interagem com os resíduos de aminoácidos GLY23, CYS25 e ASP161.

Ao analisar as interações intermoleculares, observa-se que uma das principais diferenças apresentadas entre as conformações obtidas com os isômeros E e Z dos compostos TD está nas ligações de hidrogênio com o resíduo de aminoácido ASN69. Nas conformações obtidas com o isômero E, a maior parte dos compostos TD fizeram uma ou mais ligações de hidrogênio com o resíduo de aminoácido ASN69, sendo eles TD-01 (1x), TD-02 (2x), TD-04 (1x), TD-06 (1x), TD-08 (2x) e TD-09 (3x). No entanto, nas conformações obtidas com o isômero Z, apenas os compostos TD-01 (1x), TD-06 (1x) e TD-08 (1x) fizeram ligações de hidrogênio com o resíduo de aminoácidos ASN69. Sendo 1x, 2x e 3x o número de ligações de hidrogênio que ocorreram. Assim, o aminoácido ASN69 parece ter o papel chave para a estabilidade dos compostos TD, o que favoreceu o isômero E desta série.

No entanto, para as soluções de *docking* os compostos DR, os isômeros Z obtiveram valores de *score* ligeiramente mais elevados (melhores) quando comparados com as conformações obtidas com os isômeros E para estes mesmos compostos. Ao analisar as interações intermoleculares, observa-se que mais da metade das soluções de *docking* para o isômero E dos compostos DR não fazem ligações de hidrogênio enquanto que todas as soluções para o isômero Z, destes mesmos compostos, formam ligações de hidrogênio. Além disto, observa-se que as ligações de hidrogênio que ocorreram para as soluções de *docking* para o isômero Z se concentraram, principalmente, nos resíduos de aminoácidos GLY66, MET68 e ASN69 enquanto que para as soluções de *docking* com o isômero E as poucas ligações que ocorreram estão distribuídas entre os resíduos de aminoácidos MET68, ASP161, HIS162 e GLU208. Portanto, parece que as ligações de hidrogênio realizadas entre os compostos DR e os aminoácidos GLY66 e ASN69 são importantes para aumentar a estabilidade dos compostos DR no sítio ativo da cruzaina, o que favoreceu o isômero Z.

Para cada uma das séries, os compostos com a melhor afinidade predita pela enzima cruzaina foram o DR-06 (figura 8a), para a série DR, e TD-06 (figura 8b), para a série TD, ambos possuindo um grupo fenil no substituinte.

Figura 8 - As interações intermoleculares que ocorrem nas melhores soluções de *docking* (TD-06 e DR-06) de cada série e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Legenda: (a) As interações entre o isômero Z do composto DR-06 (magenta) e os resíduos da cruzaina. (b) As interações que ocorrem entre o isômero E do composto TD-06 (ciano) e os resíduos da cruzaina. Os resíduos que fazem contatos hidrofóbicos estão na cor verde enquanto os que fazem ligações de hidrogênio estão na cor vermelha.

5.2 Avaliação da atividade citotóxica

5.2.1 Esplenócitos murinos.

A citotoxicidade utilizando timidina- H^3 foi expressa como a maior concentração testada dos compostos atóxica para os esplenócitos murinos. A saponina, controle positivo do experimento, apresentou 82,25% de inibição. Como visto na tabela 3, os valores de citotoxicidade variaram de 14,02 (TD-09) a >554,84 μM . A maioria dos compostos se destacou como atóxicos em comparação à droga de referência, são eles: TD-01, TD-02, TD-04, TD-05, TD-06, TD-07, TD-08, DR-01, DR-02, DR-03, DR-04, DR-05, DR-06 e DR-07.

Tabela 3 - Atividade citotóxica – concentração atóxica em $\mu\text{g/ml}$ e μM – frente a esplenócitos murinos de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

Composto	Concentração atóxica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração atóxica (μM)	Composto	Concentração atóxica ($\mu\text{g/ml}$)	Concentração atóxica (μM)
TD-01	>100	>378,28	DR-01	>100	>261,45
TD-02	>100	>417,9	DR-02	50	139,88
TD-03	12,5	53,11	DR-03	>100	>282,9
TD-04	>100	>554,84	DR-04	>100	>335,16
TD-05	50	222,97	DR-05	50	146,04
TD-06	>100	>391,63	DR-06	>100	>267,75
TD-07	50	256,09	DR-07	>100	>319,1
TD-08	>100	>477,85	DR-08	6,25	19,08
TD-09	3,13	14,02	DR-09	12,5	36,61
Bzn	25	96,06	Bzn	25	96,06

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: Bzn = Benzonidazol.

5.2.2 Células de linhagem hepática HepG2

Como visto na tabela 4, os valores de citotoxicidade para essas células variaram de 4,58 (DR-05) a >2.239,64 μM .

Tabela 4 - Atividade citotóxica em $\mu\text{g/ml}$ e μM frente a hepatócitos (HepG2) de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

Composto	CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CC ₅₀ (μM)	Composto	CC ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$)	CC ₅₀ (μM)
TD-01	>500	>1.891,43	DR-01	4	10,45
TD-02	>500	>2.089,51	DR-02	133,3	372,94
TD-03	11,55	49,07	DR-03	>500	>1.414,50
TD-04	250,8	1.391,55	DR-04	602,7	2.020,04
TD-05	7,1	31,66	DR-05	1,57	4,58
TD-06	254,1	995,14	DR-06	>500	>1.338,79
TD-07	176,6	904,52	DR-07	>500	>1.595,5
TD-08	223,2	1.066,56	DR-08	120,2	367,13
TD-09	>500	>2.239,64	DR-09	>500	>1.464,64
Bzn	345,3	1.326,8	Bzn	345,3	1.326,8

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: Bzn = Benzonidazol.

Os compostos que se destacaram com uma maior CC_{50} em relação ao benzonidazol e, conseqüentemente, sendo menos tóxico que ele foram: TD-01, TD-02, TD-04, TD-09, DR-03, DR-04, DR-06, DR-07 e DR-09.

5.2.3 Células de linhagem macrofágica J774

Todos os compostos testados por esse ensaio mostraram algum grau de atividade citotóxica. Como exposto na terceira coluna da tabela 5 os valores de CC_{50} variaram de 21,54 (DR-01) a 195,31 μM (DR-02). O composto DR-02 foi 4 vezes menos citotóxico frente a essa linhagem celular em relação a droga de referência. A maioria dos compostos mostrou menos toxicidade em relação ao benzonidazol e apenas 5 foram exceções (TD-07, DR-01, DR-02, DR-08 e DR-09).

Tabela 5 - Atividade citotóxica – CC_{50} em $\mu\text{g/ml}$ e μM – frente a macrófagos (J774) de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

Composto	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} (μM)	Composto	CC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	CC_{50} (μM)
TD-01	22,56	85,34	DR-01	8,24	21,54
TD-02	11,22	46,88	DR-02	69,81	195,31
TD-03	18,34	77,92	DR-03	27,29	77,2
TD-04	29,88	165,78	DR-04	36,05	120,82
TD-05	12,31	54,89	DR-05	33,34	97,38
TD-06	27,45	107,5	DR-06	24,73	66,21
TD-07	8,15	41,74	DR-07	22,16	70,71
TD-08	29,31	140,05	DR-08	13,16	40,19
TD-09	12,98	58,14	DR-09	12,36	36,2
Bzn	11,62	44,64	Bzn	11,62	44,64

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: Bzn = Benzonidazol.

5.3 Avaliação da atividade tripanocida

5.3.1 Epimastigotas

Com relação à forma epimastigota, a IC_{50} variou de 5,09 (TD-03) a 116,3 μM (DR-04) e a maioria dos compostos apresentou uma atividade anti-epimastigotas de *T. cruzi* melhor que o benzonidazol, destacando-se TD-03 e TD-06 como pode ser visto na tabela 6.

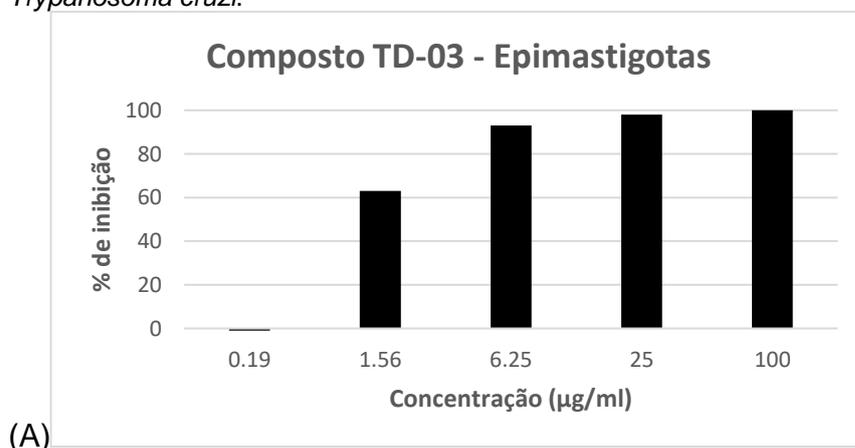
Tabela 6 - Atividade tripanocida – IC₅₀ em µg/ml e µM – frente a epimastigotas (Dm28) de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

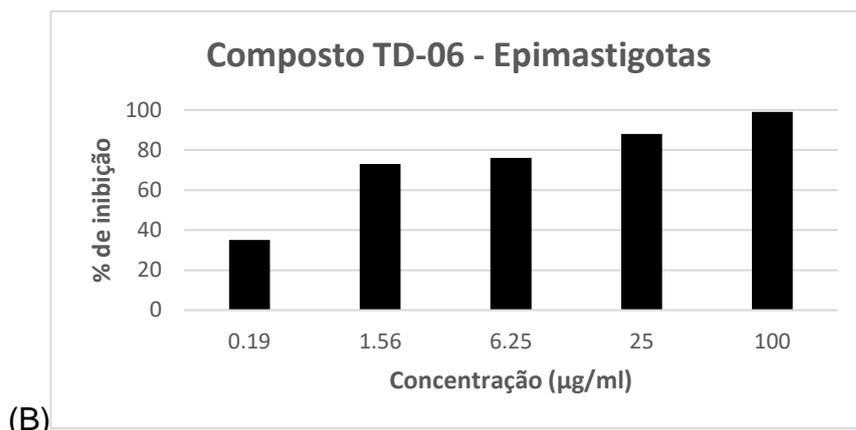
Composto	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
TD-01	29,63	112,08
TD-02	18,51	77,35
TD-03	1,2	5,09
TD-05	5,71	25,46
TD-06	1,97	7,71
TD-07	6,55	33,54
TD-08	11,74	56,09
TD-09	2,38	10,66
DR-01	36,52	95,48
DR-02	11,83	33,09
DR-04	34,7	116,3
DR-05	11,14	32,52
DR-08	32,69	99,84
DR-09	1,58	4,62
Benzonidazol	2,74	10,52

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Os testes com os compostos TD-04, DR-03, DR-06 e DR-07 foram feitos, mas os dados obtidos não foram suficientes para se calcular a IC₅₀ (ND). Além do destaque na atividade anti-epimastigota desses 2 compostos, eles também tiveram boas curvas dose-resposta, entendido como a homogeneidade do crescimento da porcentagem de inibição em função do aumento da concentração dos compostos, demonstradas no gráfico 1 (A e B).

Gráfico 1 - Atividade tripanocida dos compostos TD-03 e TD-06 frente a epimastigotas (Dm28) de *Trypanosoma cruzi*.





Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Legenda: (A) TD-03 e (B) TD-06.

5.3.2 Tripomastigotas

A atividade anti-tripomastigota dos compostos variou com um IC_{50} de 7,99 (TD-06) a 82,45 μM (TD-04). Os compostos que se destacaram por evidenciarem menor IC_{50} em relação ao benzonidazol foram TD-01, TD-03, TD-06 e TD-09 (tabela 7), sendo parte dos resultados consistente com os resultados frente a epimastigotas.

Tabela 7 - Atividade tripanocida – IC_{50} em $\mu g/ml$ e μM – frente a tripomastigotas (cepa Y) de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

Composto	IC_{50} ($\mu g/ml$)	IC_{50} (μM)
TD-01	7,5	28,37
TD-02	12,41	51,86
TD-03	2,61	15,34
TD-04	14,84	82,45
TD-06	2,04	7,99
TD-09	6,61	29,61
Benzonidazol	10,66	40,96

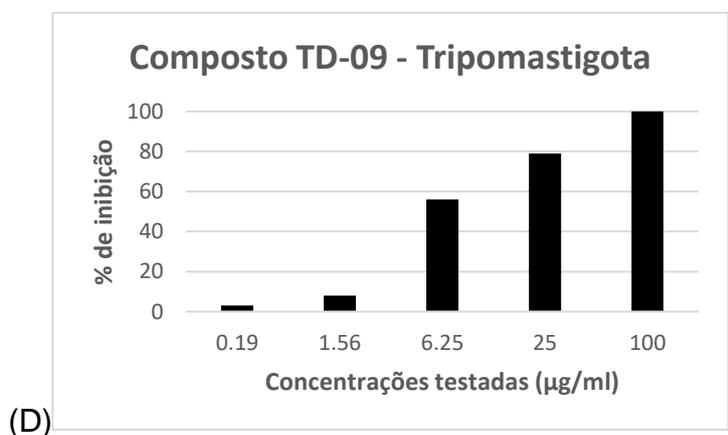
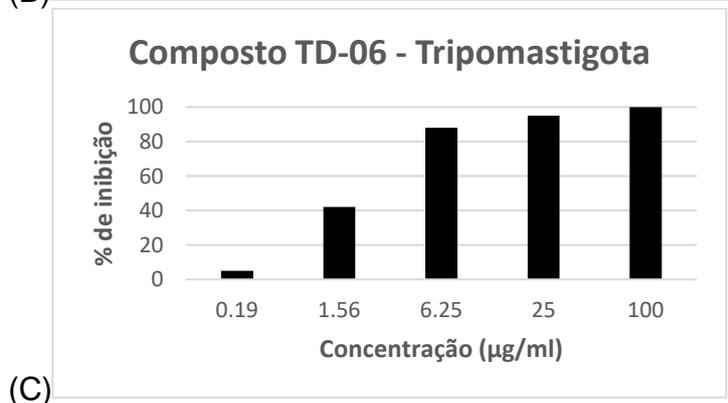
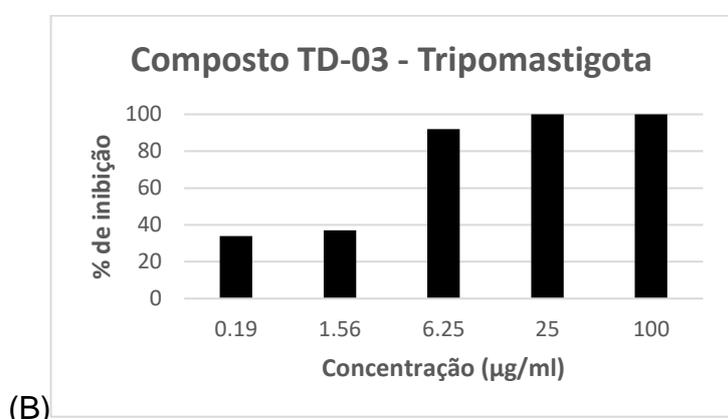
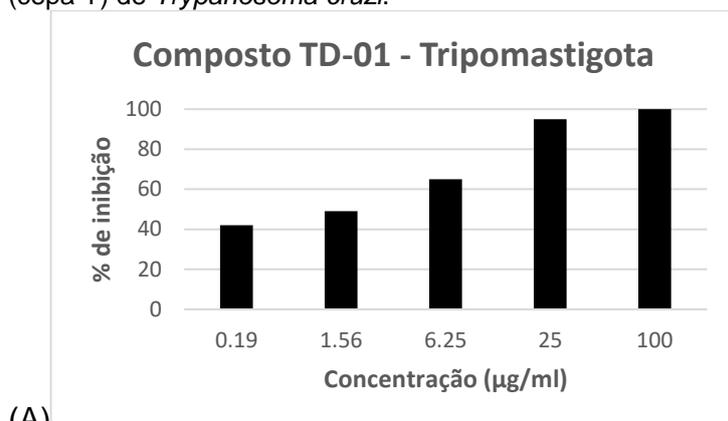
Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Legenda: ND = não determinado, os dados foram adquiridos, mas não foram suficientes para se calcular a IC_{50} .

Os testes com os compostos TD-05, TD-07, TD-08 e todos os compostos DR foram aplicados, mas os resultados não foram suficientes para aquisição da IC_{50} (ND).

Do mesmo modo que para epimastigotas, as curvas dose-resposta dos compostos destaques também se mostraram homogêneas (gráfico 2 A-D).

Gráfico 2 - Atividade tripanocida dos compostos TD-01, TD-03, TD-06 e TD-09 frente a tripomastigotas (cepa Y) de *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Legenda: (A) TD-01, (B) TD-03, (C) TD-06, (D) TD-09.

5.4 Índice de seletividade

Para verificar o quanto os compostos foram ativos para os parasitos sem causar danos às células normais, foi feito o índice de seletividade (ISe) para esta forma evolutiva. O ISe consiste na razão entre a CC_{50} ou concentração atóxica e a IC_{50} . Quanto maior o ISe, mais específica a atividade do composto para o parasito. Para obtenção do ISe foram considerados os valores em micromolar. Os compostos mais seletivos que o benzonidazol para esplenócitos, hepatócitos e macrófagos respectivamente foram: TD-06, DR-09 e TD-03 (tabela 8). Os valores de ISe menores que 1 foram considerados como NR (Não Realizado), ou seja, não houve indicativo de seletividade parasitária.

Tabela 8 - Índice de seletividade (ISe) para a forma epimastigota (Dm28) de *Trypanosoma cruzi* de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

Composto	Esplenócito murino	HepG2	J774
TD-01	>3,37	>16,87	NR
TD-02	>5,4	>23,01	NR
TD-03	>10,43	9,64	15,03
TD-05	8,75	1,24	2,15
TD-06	>50,79	129,07	13,94
TD-07	7,63	26,96	1,24
TD-08	>8,51	19,01	2,49
TD-09	1,31	>210,09	5,45
DR-01	>2,73	NR	NR
DR-02	4,22	11,27	5,9
DR-04	>2,88	17,36	1,03
DR-05	4,49	NR	29,94
DR-08	NR	3,67	NR
DR-09	7,27	>317,02	7,83
Benzonidazol	8,56	126,12	4,24

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: NR = Não Realizado, não houve indicativo de seletividade parasitária.

De acordo com a tabela 9, o composto TD-06 foi o mais seletivo em relação ao benzonidazol frente aos 3 tipos celulares testados.

Tabela 9 - Índice de seletividade (ISe) para a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* de uma nova classe de compostos tiazolidinônicos (série DR) e de tiossemicarbazonas (intermediários de sua via sintética, série TD).

Composto	Esplenócito murino	HepG2	J774
TD-01	>13,33	>66,67	3
TD-02	>8,05	>40,29	NR
TD-03	>3,46	3,19	5,07
TD-04	>6,72	16,87	2,01
TD-06	>49,01	124,54	13,45
TD-09	NR	>75,63	1,96
Benzonidazol	2,34	32,39	1,08

Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: NR = Não Realizado, não houve indicativo de seletividade parasitária.

5.5 Dosagem de óxido nítrico

O ensaio é baseado na dosagem indireta do ON, pois o mesmo é muito reativo se transformando rapidamente em nitrito ou nitrato. Devido a isso, os resultados de densidade óptica obtidos após a incubação das células com os compostos são comparados a uma curva padrão de nitrito.

O teste foi feito, mas nenhum composto demonstrou indução da produção de ON (dados não mostrados).

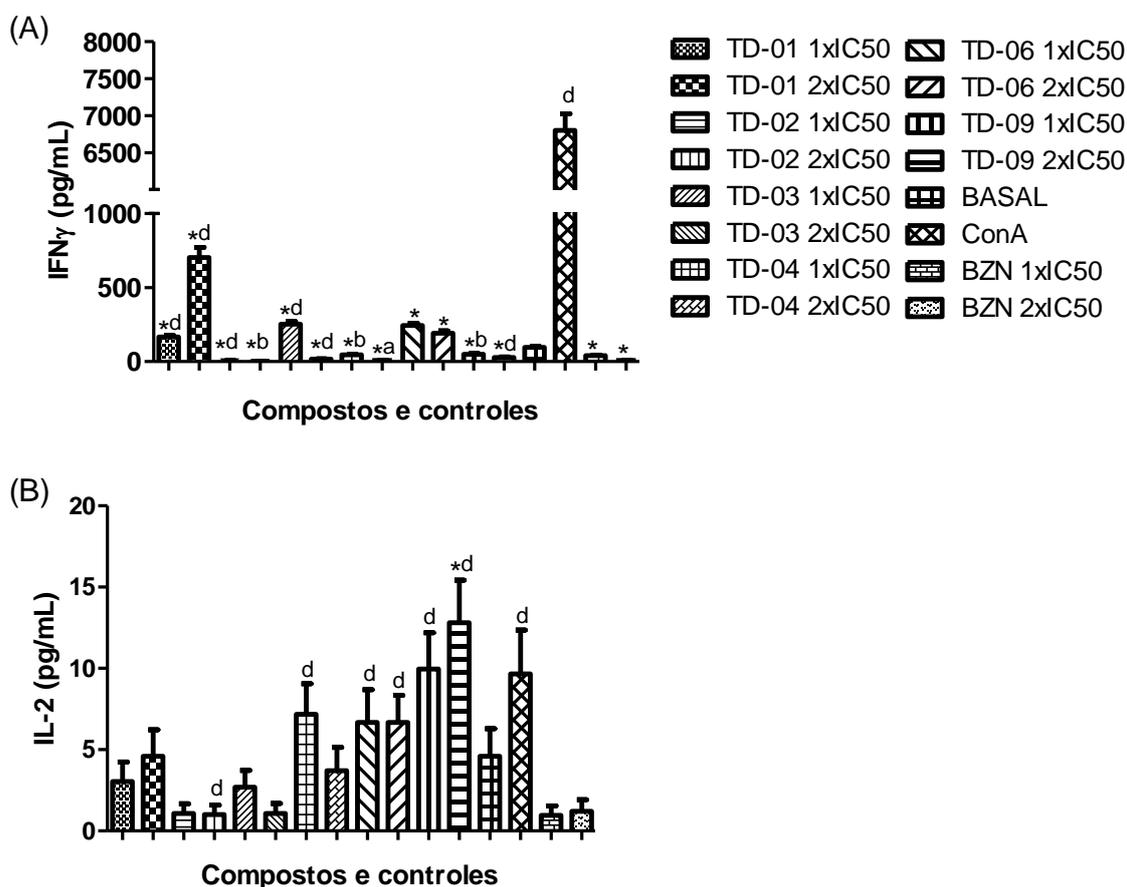
5.6 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

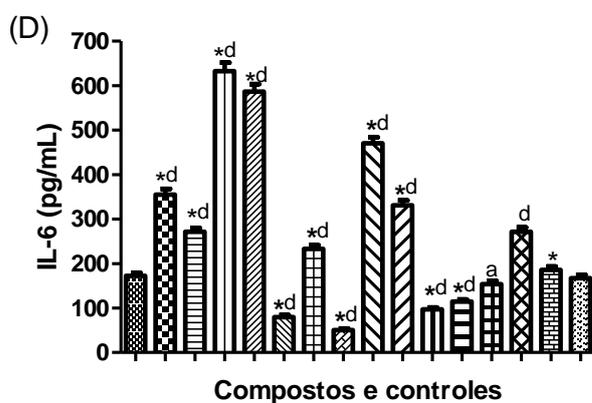
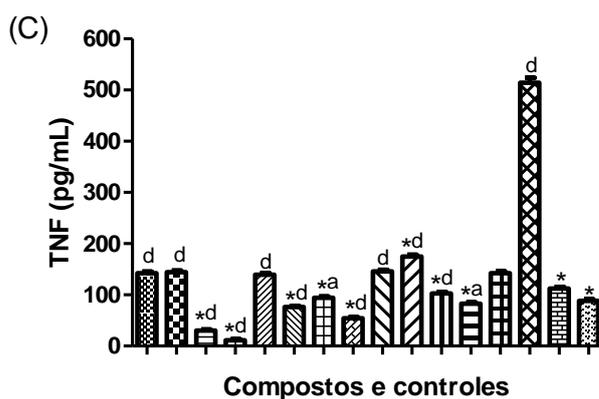
Os níveis de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-2, TNF), Th2 (IL-4, IL-6 e IL-10), e Th17 (IL-17A) foram dosados por citometria de fluxo em 4 tempos diferentes (24h, 48h, 72h e seis dias).

Houve uma variedade de perfis induzidos pelos compostos, tanto de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IFN- γ , quanto de regulatórias como IL-10. A partir do tempo de 72h, foi possível observar o aumento na variedade de produção das citocinas dos diferentes perfis pelos compostos (dado não mostrado). O tempo de 6 dias destacou-se por todas as citocinas avaliadas terem sido produzidas em maior quantidade, devido a isso ele foi o escolhido para exposição dos resultados.

Com relação à produção de IFN- γ , IL-2, TNF e IL-6 os compostos TD-01, TD-09, TD-06 e TD-02 respectivamente, foram seus melhores indutores (gráfico 3), tendo as maiores quantidades de produção dessas citocinas no tempo de 6 dias e no tratamento com 2x suas respectivas IC₅₀. Esses resultados foram estatisticamente significativos tanto com relação ao basal, quanto com relação ao tratamento com o benzonidazol (1x e 2xIC₅₀). Apenas TD-09 induziu a produção de IL-2 de maneira significativa em relação ao benzonidazol no tratamento tanto com 1x quanto com 2xIC₅₀. Vale salientar que nesse tempo o benzonidazol induziu diminuição significativa de IFN- γ e IL-2 em relação ao basal.

Gráfico 3 - Indução da produção das citocinas IFN- γ , IL-2, TNF e IL-6 pelos diferentes compostos no tempo de 6 dias.



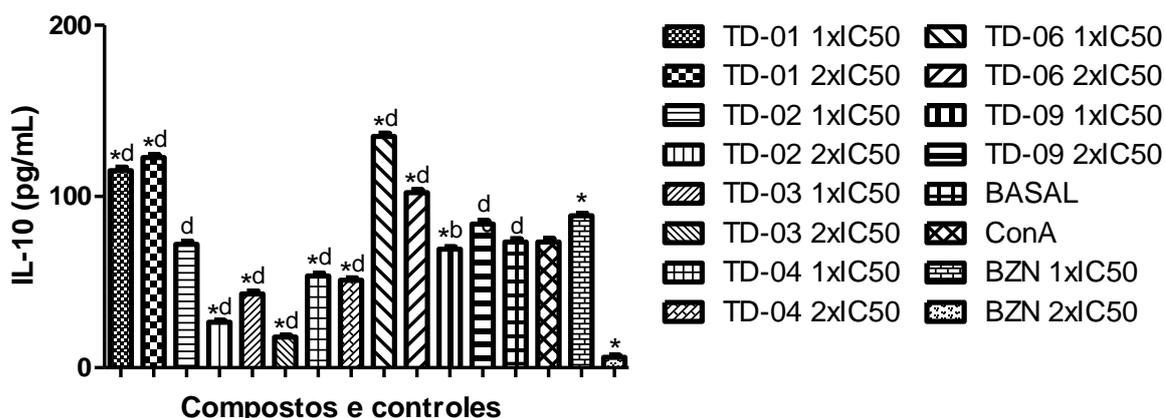


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: (A) IFN- γ , (B) IL-02, (C) TNF e (D) IL-6. Comparado com o basal, * $p < 0,05$; comparado com o tratamento com o BZN (1x e 2x a IC_{50}), ^d $p < 0,05$; comparado com tratamento com o BZN 1x IC_{50} , ^a $p < 0,05$; comparado com tratamento com o BZN 2x IC_{50} , ^b $p < 0,05$. Benzimidazol (BZN) e concanavalina A (ConA).

Com relação à citocina IL-10, a sua indução variou entre os tempos para cada composto, porém o seu maior indutor foi TD-06 na concentração de 1x IC_{50} e no tempo de 6 dias (gráfico 4). Esses resultados foram estatisticamente significativos tanto com relação ao basal, quanto com relação ao tratamento com o benzonidazol (1x e 2x IC_{50}). Não foi observada produção significativa de IL-4 frente a nenhum dos compostos e em nenhum dos tempos avaliados (dado não mostrado).

Gráfico 4 - Indução da produção da citocina IL-10 pelos diferentes compostos no tempo de 6 dias.

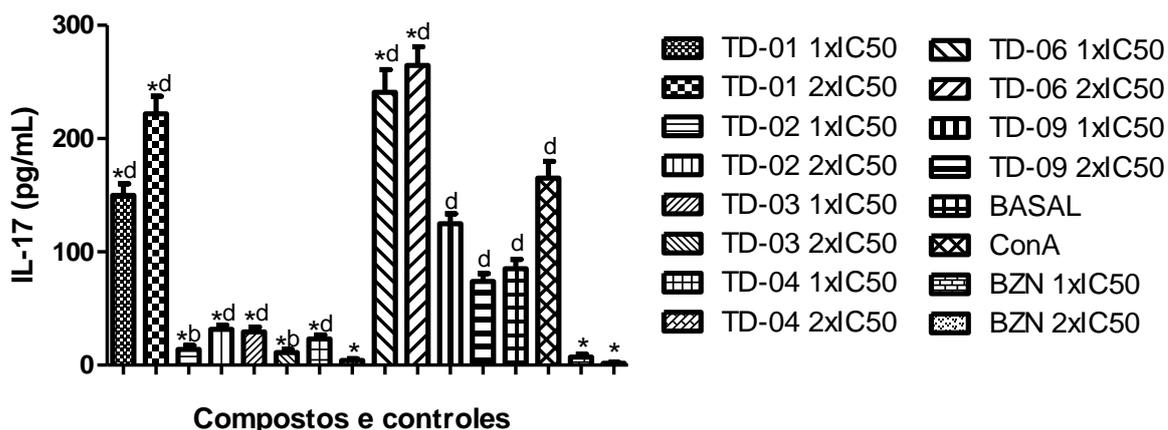


Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

Legenda: Comparado com o basal, *p <0,05; comparado com o tratamento com o BZN (1x e 2x a IC₅₀), #p <0,05; comparado com tratamento com o BZN 2xIC₅₀, ^p <0,05. Benzimidazol (BZN) e concanavalina A (ConA).

Com relação a IL-17, o composto que mais produziu essa citocina foi TD-06 no tratamento com 2xIC₅₀ no tempo de 6 dias (gráfico 5). Esse resultado foi estatisticamente significativo tanto com relação ao basal, quanto com relação ao tratamento com o benzonidazol (1x e 2xIC₅₀). Não houve diferença significativa entre o tratamento com 1x e 2x a IC₅₀ desse composto (dado não mostrado), demonstrando que tratamento com 1x e 2x a IC₅₀ são iguais indutores da produção dessa citocina.

Gráfico 5 - Indução da produção da citocina IL-17 pelos diferentes compostos no tempo de 6 dias.



Fonte: Elaborada pela autora, 2018.

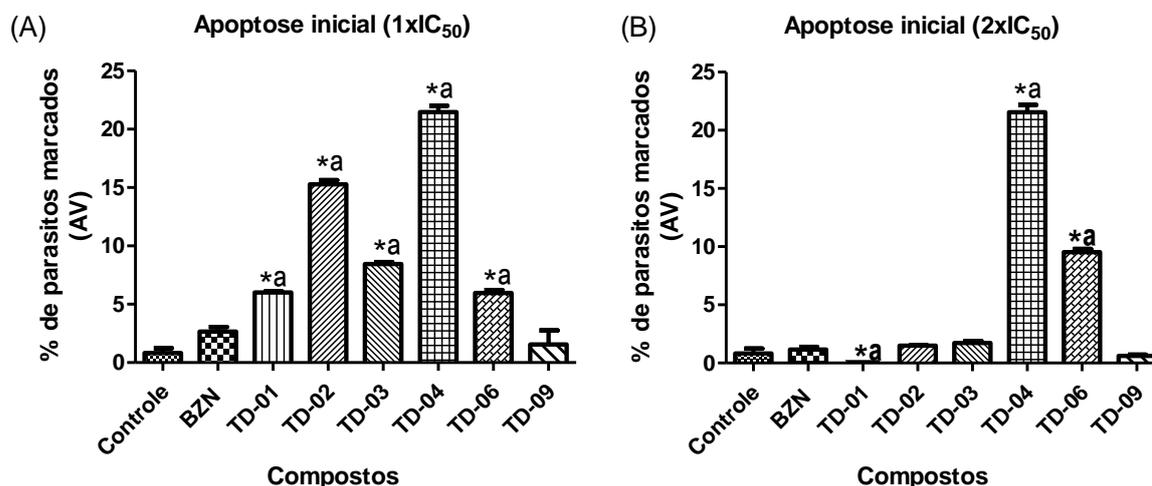
Legenda: Comparado com o basal, *p <0,05; comparado com o tratamento com o BZN (1x e 2x a IC₅₀), #p <0,05; comparado com tratamento com o BZN 2xIC₅₀, ^p <0,05. Benzimidazol (BZN) e concanavalina A (ConA).

5.7 Avaliação do perfil de morte celular por citometria de fluxo

5.7.1 Apoptose inicial

Os compostos que induziram um perfil de morte celular de apoptose inicial de maneira significativa no tratamento com 1x suas IC_{50} em relação ao controle sem tratamento e ao benzonidazol foram TD-01, TD-02, TD-03, TD-04 e TD-06 (gráfico 6A), enquanto que no tratamento com 2x IC_{50} foram TD-04 e TD-06 (gráfico 6B). O benzonidazol não demonstrou diferença significativa com relação ao controle sem tratamento.

Gráfico 6 - Indução de apoptose inicial frente ao tratamento com 1x IC_{50} e 2x IC_{50} dos compostos testados.



Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

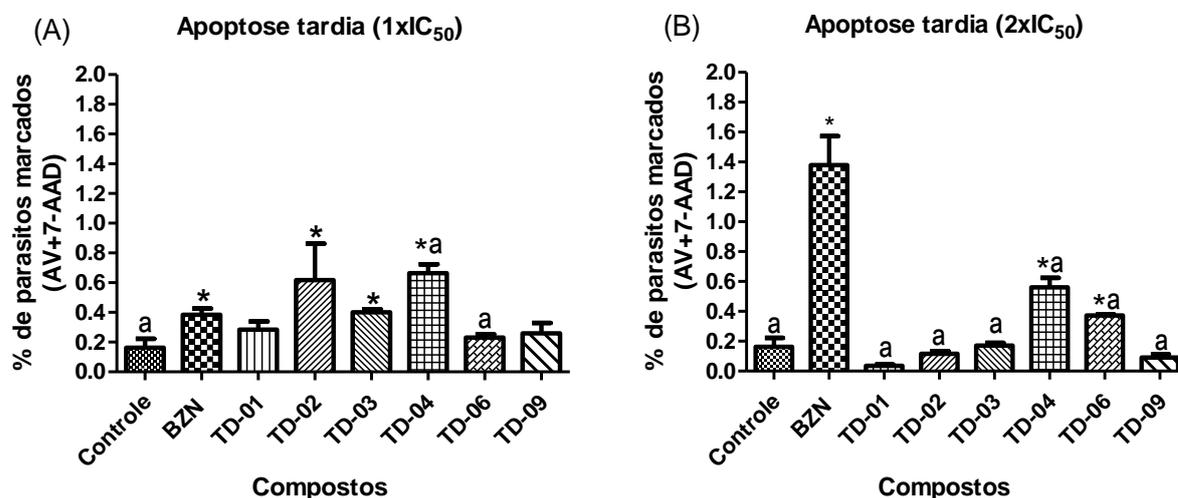
Legenda: (A) 1x IC_{50} e (B) 2x IC_{50} . Comparado ao controle sem tratamento, *p < 0,05; comparado ao tratamento com o BZN (1x e 2x a IC_{50}), ^ap < 0,05. Benzonidazol (BZN). Anexina-V (AV).

5.7.2 Apoptose tardia

Alguns dos compostos que induziram apoptose inicial também induziram apoptose tardia de maneira significativa no tratamento com 1x IC_{50} em relação ao sem tratamento, como foi o caso de TD-02, TD-03 e TD-04 (gráfico 7A), porém a porcentagem de parasitos marcados foi maior para a morte celular por apoptose inicial de maneira significativa (dado não mostrado). Apenas o composto TD-04 induziu esse tipo de morte de maneira significativa com relação ao controle sem tratamento e ao benzonidazol. No tratamento com 2x IC_{50} , nenhum dos compostos induziu

significativamente mais esse tipo de morte celular com relação ao benzonidazol (gráfico 7B).

Gráfico 7 - Indução de apoptose tardia frente ao tratamento com $1xIC_{50}$ e $2xIC_{50}$ dos compostos testados.

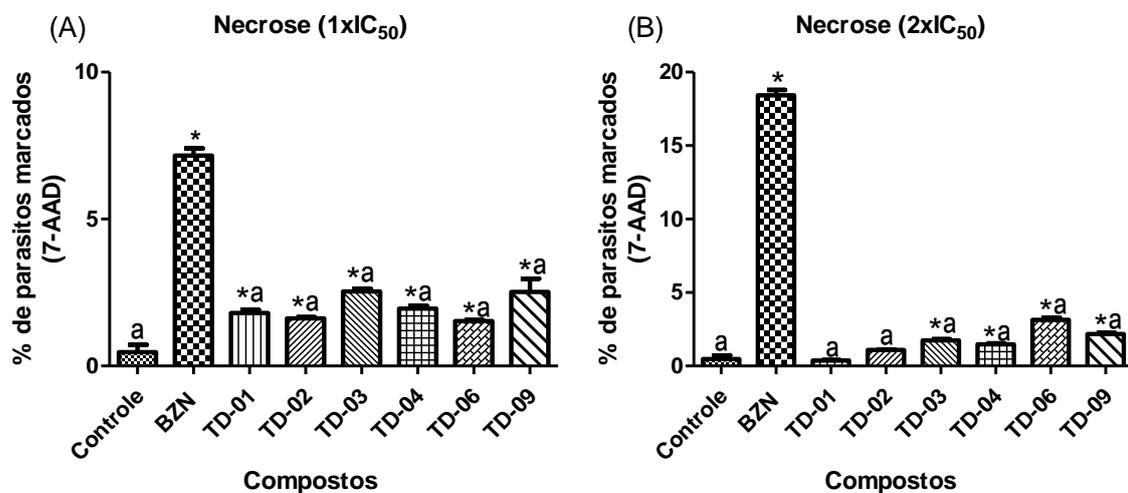


Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Legenda: (A) $1xIC_{50}$ e (B) $2xIC_{50}$. Comparado ao controle sem tratamento, * $p < 0,05$; comparado ao tratamento com o BZN ($1x$ e $2x$ a IC_{50}), $^a p < 0,05$. Benzonidazol (BZN), AV+7-AAD (dupla marcação com os marcadores anexina-V e 7-aminoactinomicina D).

5.7.3 Necrose

Com relação ao perfil necrótico, todos os compostos testados mostraram algum grau de indução no tratamento com $1xIC_{50}$ (gráfico 8A), porém a porcentagem de parasitos marcados do tratamento com os compostos, TD-01, TD-02, TD-03, TD-04 e TD-06 foi maior para o perfil apoptótico inicial de maneira significativa (dados não mostrados). O único composto que induziu apenas necrose de maneira significativa no tratamento de $1x$ e $2xIC_{50}$ em relação ao sem tratamento foi TD-09 (gráfico 8B), no entanto o benzonidazol induziu mais esse tipo de morte celular de maneira significativa em relação a TD-09. Vale salientar que o benzonidazol induziu os 3 tipos de morte celular, mas demonstrou maior porcentagem de parasitos marcados para necrose, tanto no tratamento com $1x$ quanto com $2xIC_{50}$ de maneira significativa (dados não mostrados).

Gráfico 8 - Indução de necrose frente ao tratamento com $1 \times IC_{50}$ e $2 \times IC_{50}$ dos compostos testados.

Fonte: Elaborado pela autora, 2018.

Legenda: (A) $1 \times IC_{50}$ e (B) $2 \times IC_{50}$. Comparado ao controle sem tratamento, * $p < 0,05$; comparado ao tratamento com o BZN ($1 \times$ e $2 \times$ a IC_{50}), ^a $p < 0,05$. Benzonidazol (BZN), 7-aminoactinomicina D (7-AAD).

6 DISCUSSÃO

A doença de Chagas é uma doença negligenciada e que possui um tratamento com eficácia variada entre as fases da doença e com alta toxicidade. Os custos mundiais com a doença de Chagas atualmente estão em torno de US\$7-19 bilhões por ano, o que é um alto impacto econômico (LEE et al., 2013; PINAZO; GASCON, 2015). O tratamento atual (Benzonidazol) é mais eficaz na fase aguda em relação à fase crônica e, recentemente, ficou demonstrado que o mesmo não possui impacto positivo no tratamento de pacientes com a forma cardíaca na fase crônica (MORILLO et al., 2015). Devido a essa diferença de eficácia e à alta toxicidade associada ao tratamento atual, a busca por uma nova abordagem terapêutica para a doença de Chagas é uma das principais metas relativas a essa doença atualmente (DUMONTEIL; HERRERA, 2017).

Algumas das classes investigadas para um novo tratamento da doença de Chagas e que são desenhadas tendo alvos específicos são as tiossemicarbazonas e as tiazolidinonas (SILVA; SILVA, 2017; TRIPATHI et al., 2014). Os compostos testados no presente trabalho (TD-01 a 09 e DR-01 a 09) 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).

Para que se chegue a uma nova abordagem terapêutica para a doença, lança-se mão diferentes estratégias, como quimioterapia combinada, reposicionamento de drogas e a identificação de novos compostos alvos-específicos (BAHIA; DINIZ; MOSQUEIRA, 2014). Para a identificação de compostos alvos-específicos, utiliza-se ferramentas computacionais para o desenho dos compostos (FERREIRA et al., 2015). Esses compostos são muitas vezes investigados *in silico* com relação à afinidade deles com o alvo biológico o qual está sendo desenhado utilizando-se do *docking* molecular (WASZKOWYCZ; CLARK; GANCIA, 2011).

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, 2013). O alvo utilizado deve ter um papel biológico importante, em que a modulação da sua atividade pela molécula leve a alteração na via onde esteja envolvido (OVERINGTON; AL-LAZIKANI; HOPKINS, 2006; SOUSA et al., 2010).

No caso deste projeto, os ligantes foram os compostos e o alvo foi a enzima de *T. cruzi*, cruzaina. É preciso destacar que é de suma importância que os ensaios *in silico* e *in vitro* sejam feitos em paralelo, pois moléculas que não tenham uma boa pontuação por métodos computacionais, podem não ser avaliados *in vitro*, podendo levar ao descarte precoce de *hits* (moléculas significativamente ativas) (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2011).

In silico, os compostos da série DR demonstraram uma maior afinidade pela cruzaina. No entanto, o composto TD-06, que obteve interessantes resultados nos testes *in vitro*, demonstrou afinidade semelhante à série DR. Os compostos DR-06 e TD-06 foram os que tiveram a melhor afinidade pela cruzaina e compartilham o radical 4-(fenil)-fenil como substituinte, podendo esse radical ter influenciado nessa atividade. Levando em consideração que os compostos que aparecem na segunda posição (TD-03 e DR-03) e terceira posição (TD-01 e DR-01), em suas respectivas séries, em termos de afinidade predita também possuem um grupo bastante volumoso e hidrofóbico como substituinte – 4-(*t*-butil)-fenil e 4-(morfolinil)-fenil, respectivamente – acredita-se que realizar modificações nos compostos TD e DR de forma a maximizar os contatos hidrofóbicos no sítio ativo da enzima cruzaina possa ter capacidade de aumentar a potência destes candidatos a fármacos, hipótese que parece estar amparada pelos valores de IC₅₀ desses compostos.

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). Devido a 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 é

analisar a atividade imunomoduladora. Portanto os compostos não deveriam ser tóxicos frente a essas células. Já o teste em células hepáticas é interessante pois o fígado é um órgão ativo no metabolismo de drogas (BJÖRNSSON, 2016). Dentre os diferentes tipos celulares testados, a maioria dos compostos demonstrou ser menos tóxica que a droga de referência. Frente a esplenócitos a droga menos tóxica foi TD-04, frente a hepatócitos foi TD-09 e frente a macrófagos foi DR-02. Vale salientar que também a maioria dos compostos demonstrou valores de citotoxicidades bem variados entre os tipos celulares. Devido a 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.

Além da atividade citotóxica, é importante que se investigue 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). Nenhum composto da série DR demonstrou atividade frente a tripomastigotas. O composto que demonstrou ter melhor IC₅₀ que a droga de referência frente a epimastigotas foi TD-03, no entanto o composto que demonstrou ter melhor atividade frente a tripomastigotas foi TD-06. Como discutido anteriormente, esses dois compostos possuem um grupo bastante volumoso e hidrofóbico como substituinte – 4-(t-butil)-fenil e 4-(fenil)-fenil respectivamente – que podem ter influenciado nessa atividade. Essa atividade corrobora com estudos prévios desenvolvidos por Moreita et al. (2014), em que a substituição do anel fenílico por outro substituinte (4-piridinil) produziu compostos tiazolidinônicos inativos frente a *T. cruzi* e os compostos que continham fenil na posição 4 do anel fenílico foram os dois compostos mais ativos frente o parasito (MOREIRA et al., 2014). Espíndola et al. (2015) também observaram que um segundo anel fenílico na estrutura de tiossemicarbazonas aumentou a atividade tripanocida dos compostos.

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 estudo, buscamos entender como os compostos influenciam na produção de diferentes citocinas importantes no curso da doença de Chagas. Um dos elementos envolvidos na resposta inicial de macrófagos à *T. cruzi* é o radical livre ON. Quando há a produção de citocinas pró-inflamatórias pelo sistema imune como IL-12, TNF e IFN- γ , há ativação da enzima iNOS com o objetivo de aumentar a produção de ON e controlar o parasitismo (MICHAILOWSKY

et al., 2001). Apesar de ter havido a produção significativa dessas citocinas por alguns dos compostos, não detectamos a produção de ON nos sobrenadantes de culturas dosados.

Com relação à resposta imune adaptativa, há também a participação dos linfócitos T auxiliares CD4+. 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 do Th2 de suscetibilidade à doença de Chagas (GUEDES et al., 2009; KUMAR; TARLETON, 2001). Alguns dos compostos como TD-01, TD-02, TD-06 e TD-09 induziram de maneira significativa citocinas do perfil Th1. Com relação ao perfil Th2, a citocina IL-10 tem se mostrado protetora nas fases iniciais da doença de Chagas experimental, inclusive prevenindo a miocardite aguda em camundongos (ROFFÊ et al., 2010). O principal indutor dessa citocina foi TD-06.

Ainda dentro desse contexto do equilíbrio de citocinas do perfil T auxiliar, também 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 IL-17 ajuda no combate à *T. cruzi*. Camundongos C57BL/6 deficientes na produção dessa citocina e infectados com *T. cruzi* possuíam menor índice de sobrevivência, maior parasitemia e falência múltipla de órgãos, além de menor produção das citocinas IFN- γ , TNF 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 em mente, fica clara a importância dessa citocina na imunopatogênese da doença, tendo o composto TD-06 sido o seu principal indutor.

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” 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 morte celular programada 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. A maioria dos compostos induziu apoptose inicial, além de maior porcentagem de parasitos marcados para esse tipo de morte. O composto TD-06, que foi um dos menos tóxicos e mais ativos frente o parasito, induziu significativamente apoptose inicial. É interessante salientar que a droga de referência, benzonidazol, induziu de maneira significativa necrose em relação ao sem tratamento e em relação aos tratamentos com cada composto, tendo a maior porcentagem de parasitas marcados para esse tipo de morte celular. A necrose não é um tipo de morte celular ideal nesse caso, pois como há a perda da integridade da membrana e conseqüentemente o extravasamento dos componentes intracelulares, leva à inflamação podendo acarretar em maiores danos teciduais (GREEN; LLAMBI, 2017).

Vale discutir a participação do composto TD-09 que demonstrou atividade frente a epimastigotas quase similar à droga de referência e menor que a droga de referência frente a tripomastigotas, porém demonstrou toxicidade frente aos esplenócitos murinos. Essa toxicidade pode ter sido refletida na produção de citocinas pró-inflamatórias aumentada, como IL-2, a qual o composto TD-09 foi o maior indutor. Além disso, também pode ter influência na indução de morte celular parasitária, pois esse composto foi o único dos compostos que induziu de maneira significativa apenas necrose. Essa maior toxicidade pode ser atribuída ao radical 3,4-metilenodioxo-fenil, pois a sua contraparte DR-09 teve uma toxicidade semelhante à sua frente às células testadas. Essa indução de tipos de morte celular variados entre compostos de uma mesma classe também foi descrita em estudo de Da Silva et al. (2017) com compostos aril-tiossemicarbazonicos.

Sendo assim, o composto TD-06 demonstrou afinidade *in silico* pela enzima cruzaina; ser mais ativo que a droga de referência frente a epimastigotas e

tripomastigotas; ser menos tóxico; ter bons ISe para epimastigotas e os melhores ISe para tripomastigotas frente às três linhagens celulares testadas; induzir um perfil pró-inflamatório com regulação, principalmente influenciando na produção de TNF, IL-10 e IL-17; além de induzir morte celular parasitária por apoptose. Esse composto é uma tiossemicarbazona que possui em sua estrutura um radical 4-(fenil)-fenil como substituinte, podendo essas características terem sido decisivas para as atividades encontradas.

Para uma profunda e correta 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 ensaios clínicos (ROMANHA et al., 2010; SALES-JÚNIOR et al., 2017).

7 CONCLUSÃO

- a) Os compostos DR demonstraram *in silico* uma maior afinidade predita pela cruzaina quando comparado com suas respectivas contrapartes TD. No entanto, o composto TD-06 teve afinidade (*score*) similar aos compostos DR;
- b) A maioria dos compostos se mostrou menos tóxico que droga de referência;
- c) Com relação a atividade tripanocida, dois compostos demonstraram melhor atividade (menor IC₅₀) em relação à droga de referência frente a epimastigotas (TD-03 e TD-06) e, além desses dois também terem sido ativos frente a tripomastigotas, mais dois compostos foram destaque frente a essa forma evolutiva, TD-01, e TD-09;
- d) Houve indução de diferentes citocinas pelos compostos, tendo sido destaque o composto TD-06, pois ele induziu um perfil pró-inflamatório com regulação (TNF, IL-10 e IL-17) que é o ideal para uma droga que possa vir a ser utilizada para a doença de Chagas. Apesar disso, não houve indução da produção de ON;
- e) Os compostos demonstraram indução dos diferentes tipos de morte celular, porém houve uma maior porcentagem de parasitos marcados para apoptose inicial. Vale destacar que a droga de referência induziu necrose de maneira bastante consistente, o que não é interessante devido ao alto componente inflamatório associado a esse tipo de morte celular; Diante do exposto, ficou demonstrado que o composto TD-06 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.

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 parasitaemia 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.
- 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.
- ALBAREDA, M. C.; LAUCELLA, S. A. Modulation of *Trypanosoma cruzi*-specific T-cell responses after chemotherapy for chronic Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 414-421, 2015.
- 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.
- 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. 2016.
- 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.
- 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. 2017

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.

ARAÚJO, F. F. et al. Potential role of CD4+ CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, v. 12, p. 2797-2806, 2006.

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. 2016.

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.

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

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. 2017.

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.

BAHIA, M. T.; DINIZ, L. F.; MOSQUEIRA, V. C. F. Therapeutical approaches under investigation for treatment of Chagas disease. **Expert opinion on investigational drugs**, London, v. 23, n. 9, p. 1225-1237, 2014.

BALAÑA-FOUCE, R. et al. Trypanosomatids topoisomerase re-visited. New structural findings and role in drug discovery. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, New York, v. 4, n. 3, p. 326-337, 2014.

BATISTA, C. M. et al. *Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes. **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. 2017.

- 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, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.
- BJÖRNSSON, E. S. Hepatotoxicity by drugs: the most common implicated agents. **International journal of molecular sciences**, Basel, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2016.
- 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. 2017.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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. 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.

CARDOSO, M. V. O. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 86, p. 48-59, 2014.

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. 2016.

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. 2016.

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. 2016.

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

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

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.

COELHO, P. S. et al. Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production by IFN- γ -primed-macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, Winston-Salem, v. 71, n. 5, p. 837-844, 2002.

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

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 TNFA/TNFR2 genes and Chagas disease in a Colombian endemic population. **Cytokine**, San Diego, v. 57, n. 3, p. 398-401, 2012.

DA SILVA, A. C. et al. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. **Experimental parasitology**, New York, v. 177, p. 57-65, 2017.

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.

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. 2016.

DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

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.

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

DONNICI, C. L. et al. Ruthenium complexes endowed with potent anti-*Trypanosoma cruzi* activity: Synthesis, biological characterization and structure–activity relationships. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v. 17, n. 14, p. 5038-5043, 2009.

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

DRIGO, S. A. et al. TNF 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 NEGLETED 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. 2016.

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. 2016.

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.

DUMONTEIL, E.; HERRERA, C. Ten years of Chagas disease research: Looking back to achievements, looking ahead to challenges. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 11, n. 4, 2017. Disponível em:

<<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0005422>>. Acesso em: 17 set. 2017.

DUSCHAK, V. G. Targets and Patented Drugs for Chemotherapy of Chagas Disease in the Last 15 Years-Period. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, v. 11, n. 2, p. 74-173, 2016.

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. 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. 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. 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. 2016.

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. 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.

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.

- 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.
- 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.
- 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.
- 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. 2017.
- 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.
- 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.
- GILBERT, I. H. Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches: miniperspectives series on phenotypic screening for antiinfective 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* transsialidase: PEGylation of lactose analogs with multiarm polyethyleneglycol. **Glycobiology**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 1363-1373, 2012.

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?. **Trends in parasitology**, Oxford, v. 19, n. 1, p. 19-22, 2003.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2003.

GOMES, J. A. S. et al. Inflammatory mediators from monocytes down-regulate cellular proliferation and enhance cytokines production in patients with polar clinical forms of Chagas disease. **Human immunology**, New York, v. 75, n. 1, p. 20-28, 2014.

GOMES, P. A. T. M et al. Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 111, p. 46-57, 2016.

GREEN, D. R.; LLAMBI, F. Cell death signaling. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, New York, v. 7, n. 12 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4665079/>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

GU, C.; WU, L.; LI, X. IL-17 family: cytokines, receptors and signaling. **Cytokine**, San Diego, v. 64, n. 2, p. 477-485, 2013.

GUEDES, P. M. M. et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production during the acute infection phase. **Veterinary immunology and immunopathology**, Amsterdam, v. 130, n. 1, p. 43-52, 2009.

GUEDES, P. M. M. et al. IL-17 produced during *Trypanosoma cruzi* infection plays a central role in regulating parasite-induced myocarditis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 2, 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000604>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

GUEDES, P. M. M. et al. 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 Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 4, 2012. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0000604>>. Acesso em: 6 jan. 2016.

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. 2016.

- 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. 2017.
- 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.
- HARTH, G. et al. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 58, n. 1, p. 17-24, 1993.
- 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.
- HERNANDES, M. Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v. 18, n. 22, p. 7826-7835, 2010.
- 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.
- 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.
- 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. 127, 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.
- 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.
- 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**, New York, v. 2017, 2017.

Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/mi/2017/3908061/>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

LEE, B. Y., et al. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, London, v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.

LEITE, A. C. L. et al. Synthesis, docking, and *in vitro* activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v. 14, n. 11, p. 3749-3757, 2006.

LEITE, A. C. L. et al. Synthesis, Cruzain Docking, and *in vitro* Studies of Aryl-4-Oxothiazolyhydrazones Against *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 2, n. 9, p. 1339-1345, 2007.

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.

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.

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.

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.

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. 2017.

- 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.
- MCKERROW, J. H.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. **Bioorganic & medicinal chemistry**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 639-644, 1999.
- MCKERROW, J. H. et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 263-269, 2009.
- 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.
- 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.
- MICHAILOWSKY, 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.
- MILLER, B. R.; ROITBERG, A. E. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a drug target against Chagas disease (American trypanosomiasis). **Future medicinal chemistry**, London, v. 5, n. 15, p. 1889-1900, 2013.
- 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**, New York, 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**, Baltimore, v. 185, n. 2, p. 1150-1157, 2010.
- 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**, London, v. 4, p. 4703, 2014.
- MOREIRA, D. R. M. et al. Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Current drug targets**, Hilversum, v. 10, n. 3, p. 212-231, 2009.

- 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**, Easton, v. 55, n. 24, p. 10918-10936, 2012.
- MOREIRA, D. R. M. et al. Structural Design, Synthesis and Structure–Activity Relationships of Thiazolidinones with Enhanced Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity. **ChemMedChem**, Weinheim, v. 9, n. 1, p. 177-188, 2014.
- MOREIRA, D. R. M. et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 75, p. 467-478, 2014
- 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.
- NAGAJYOTHI, F. et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 634-643, 2012.
- 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.
- 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.
- 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. 2016.
- 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. 2016.
- 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. 2017.
- 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.

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, V. R. A. et al. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. **Parasitology**, London, v. 129, n. 05, p. 563-570, 2004.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 17, n. 5, p. 339-345, 2010.

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. 2016.

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.

PEREIRA, M. G. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to manage internal cholesterol levels under nutritional lipid stress conditions. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 6, 2015. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0128949>>. Acesso em: 16 mai. 2017.

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. 2016.

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.
- PINAZO, M.J.; GASCON, J. Chagas disease: from Latin America to the world. **Gastroenterol Hepatol**, Barcelona, v. 33, n. 3, p. 191-200, 2015.
- 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.
- PINTO, A. Y. N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 41, n. 6, p. 602-614, 2008.
- PISSETTI, C. W. et al. Association between the lymphotoxin-alpha gene polymorphism and chagasic cardiopathy. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, New York, 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**, Berlim, 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. 2017.
- 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. 2016.
- 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.
- 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. 2017.
- RASSI-JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p.1388-1402, 2010.
- 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. 2017.

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.

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. 2017.

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. 2017.

ROFFÊ, E. et al. IL-10 limits parasite burden and protects against fatal myocarditis in a mouse model of *Trypanosoma cruzi* infection. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v. 188, n. 2, p. 649-660, 2012.

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.

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.

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.

SANT'ANNA, C. et al. All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. **Histochemistry and cell biology**, Berlin, 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.

SCHMITZ, V. et al. Proteolytic generation of kinins in tissues infected by *Trypanosoma cruzi* depends on CXC chemokine secretion by macrophages activated via Toll-like 2 receptors. **Journal of Leukocyte biology**, Winston-Salem, v. 85, n. 6, p. 1005-1014, 2009.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.

SILES, R. et al. Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, Oxford, v. 16, n. 16, p. 4405-4409, 2006.

SILVA, B. V.; SILVA, B. N. M. Thio-and Semicarbazones: Hope in the Search for Treatment of Leishmaniasis and Chagas Disease. **Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 2, p. 110-126, 2017.

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.

SILVA, B. V.; SILVA, N. M. B. Thio-and Semicarbazones: Hope in the Search for Treatment of Leishmaniasis and Chagas Disease. **Medicinal Chemistry**, Paris, v. 13, n. 2, p. 110-126, 2017.

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, 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.

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. 2017.

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. 2016.

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**, San Francisco, v. 12, n. 3, 2017. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0172833>>. Acesso em: 8 jun. 2016.

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.

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. **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. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 3, p. 592-630, 2011.
- TENÓRIO, R. P. et al. Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, ago. 2005.
- 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.
- 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.
- TRIPATHI, A. C., et al. 4-Thiazolidinones: the advances continue.... **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 72, p. 52-77, 2014.
- 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.
- 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.

WASZKOWYCZ, B.; CLARK, D. E.; GANCIA, E. Outstanding challenges in protein–ligand docking and structure-based virtual screening. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 1, n. 2, p. 229-259, 2011.

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.

ANEXO A – CEUA 0266/05


 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

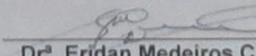
Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado: AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA Protocolado sob o Nº 26/2011, coordenado pelo (a) pesquisador (a) **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** 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 reunião 09/02/2012. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2016

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
CAMUNDONGO MUS MUSCULUS BALB/c 60 dias 20g	600
TOTAL 600	

We certify that the project entitled AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA (CEUA Protocol Nº 26/2011), coordinated by **VALÉRIA REGO ALVES PEREIRA** 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 09, 2012. In the present version this project is licensed and valid until February, 2016

Recife (Pe, Brazil) - abril 16, 2012.


Dr. Eridan Medeiros Coutinho
 Vice - Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ


Eridan M. Coutinho M. D. Ph.D
 Pesquisadora Emérita de FIOCRUZ
 Coordenadora de CEUACpAM
 Recife - Brasil

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.fiocruz.br

ANEXO B – CEUA 102/2016


 Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

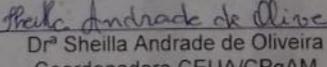
Certificado de Aprovação

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


 Drª Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Drª Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora da Comissão de Ética
 no Uso de Animais - CEUA
 Mat: SIAPE 1554975
 e-mail: sheilla@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