



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

JOHN WASHINGTON CAVALCANTE

EFEITO ANTIPARASITÁRIO DO CURCUMINOIDE SINTÉTICO

(1E,4E)-1,5-BIS(4-METOXIFENIL) PENTA-1,4-DIEN-3-ONA SOBRE *Trypanosoma cruzi*

CEPA Y: MECANISMOS DE AÇÃO E SINERGISMO

FORTALEZA

2024

JOHN WASHINGTON CAVALCANTE

**EFEITO ANTIPARASITÁRIO DO CURCUMINOIDE SINTÉTICO
(1E,4E)-1,5-BIS(4-METOXIFENIL) PENTA-1,4-DIEN-3-ONA SOBRE *Trypanosoma cruzi*
CEPA Y: MECANISMOS DE AÇÃO E SINERGISMO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Linha de pesquisa: Biologia para a saúde.

Orientador: Prof. Dr. Ramon Róseo Paula
Pessoa Bezerra de Menezes

**FORTALEZA
2024**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C364e Cavalcante, John Washington.
Efeito antiparasitário do curcuminóide sintético (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-ona sobre *Trypanosoma cruzi* cepa y: mecanismos de ação e sinergismo / John Washington Cavalcante. – 2024.
127 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2024.
Orientação: Prof. Dr. Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. Derivados da Curcumina. 4. Morte celular. 5. Sinergismo. I. Título.

CDD 615

JOHN WASHINGTON CAVALCANTE

**EFEITO ANTIPARASITÁRIO DO CURCUMINOIDE SINTÉTICO
(1E,4E)-1,5-BIS(4-METOXIFENIL) PENTA-1,4-DIEN-3-ONA SOBRE *Trypanosoma cruzi*
CEPA Y: MECANISMOS DE AÇÃO E SINERGISMO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Aprovada em: ____ de _____ de 2024

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ramon Róseo Paula Pessoa Bezerra de Menezes (Orientador)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dra. Maria Elenir Nobre Pinheiro
Universidade Federal do Ceará – UFC

Profª. Dr. Emmanuel Silva Marinho
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Profª. Dra. Lorena Mayana Beserra de Oliveira
Universidade Estadual do Ceará – UECE

Profª. Dra. Carolina Sidrim de Paula Cavalcante
Centro Universitário 7 de Setembro - UNI7

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS por todas as oportunidades concedidas a mim, pela força e tranquilidade nos momentos de fraqueza e dificuldades.

À minha Mãe (*in memoriam*) por todos os seus ensinamentos, carinho, proteção e amor incondicional. Ao meu companheiro Airton, sempre ao meu lado, obrigado pela compreensão e paciência demonstrada durante o período do projeto.

Ao meu queridíssimo orientador, Prof. Ramon, pela sua inestimável orientação, apoio e incentivo durante todo o processo de elaboração desta tese. Agradeço os ensinamentos, a paciência, dedicação, as valiosas sugestões e a constante disponibilidade para me orientar na superação dos desafios encontrados, e por sempre me manter motivado.

Agradecimento especial para Naiara, a qual me levou a conhecer meu professor orientador, Prof. Ramon, minha eterna gratidão.

Aos professores Hélcio Santos, Emmanuel Marinho e Márcia Marinho, por terem cedido a molécula do estudo e pela contribuição nos ensaios de docking molecular.

A Profa. Alice, por ter cedido o Laboratório de Bioprospecção Farmacêutica e Bioquímica Clínica (LBFBC), para realização dos experimentos.

A todos os colegas do Laboratório (LBFBC), IC's, mestrandos e doutorandos, em especial ao Emanuel e Lyanna, que sempre me ajudaram em todos os experimentos, a ajuda de vocês foi fundamental, meu eterno agradecimento.

Ao David, Marcelo e Yasmin, pela grande ajuda e contribuição nos experimentos.

À banca examinadora, pelo tempo dedicado à leitura, avaliação, contribuição e enriquecimento deste trabalho.

A todos os professores do departamento de Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas (DACT), ao Programa de pós-graduação em Ciências farmacêuticas (PGCF) e a Universidade Federal do Ceará (UFC), que de uma forma direta ou indireta contribuíram para meu crescimento e aprendizado.

RESUMO

A Doença de Chagas (DC), transmitida pelo *T. cruzi*, é considerada uma doença negligenciada e ainda um grande problema de saúde pública. O principal medicamento disponível para o tratamento é o benznidazol, que apresenta reações adversas graves e pouca eficácia na fase crônica da DC. Dessa forma, este estudo foi desenhado para investigar o potencial efeito terapêutico do derivado curcuminóide sintético (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil) penta-1,4-dien-3-ona (DBAn), contra cepa Y de *T. cruzi* utilizando modelos *in vitro* e *in silico*. Inicialmente, foi realizado ensaio de citotoxicidade onde o tratamento de células LLC-MK2 com DBAn apresentou CC_{50} de 1277 ± 348 , assim como um índice de seletividade de 36, demonstrando valor 15 vezes maior que o benznidazol. Além disso, DBAn mostrou atividade inibitória em todos os três estágios da vida do *T. cruzi*. Nas formas epimastigotas, DBAn apresentou uma IC_{50} de $61,81 \pm 0,83 \mu\text{M}$, com valores significativos entre as concentrações 62,5 - 1000 μM . Nessas mesmas concentrações, DBAn apresentou uma LC_{50} de $35,46 \pm 0,23 \mu\text{M}$ em formas tripomastigotas. Nas formas intracelulares e replicativas do *T. cruzi*, o DBAn foi capaz de diminuir a quantidade de células infectadas, bem como o número de amastigotas em todas as concentrações testadas: 15,6; 31,2 e 62,5 μM . Nos ensaios de citometria de fluxo, DBAn foi capaz de induzir a produção de EROs (DCFH2-DA); assim como alterações no potencial de membrana mitocondrial (Rho123 - $\Delta\Psi\text{m}$); também foram analisadas vias indutoras de morte celular, como necrose (7-AAD) e apoptose (Ax/PE), onde induziu eventos significativos de morte celular nos parasitos. O estudo *in silico* permitiu prever que a DBAn é uma molécula lipossolúvel e com boa biodisponibilidade oral. No docking molecular, nossos resultados mostraram interações entre DBAn e as enzimas GAPDH, Tripanotiona Redutase e Cruzaina. Foi observado aumento de valores de energia de afinidade (ΔG) comparados ao Bz. Os ensaios de sinergismo entre DBAn e Bz, mostraram não haver citotoxicidade em células LLC-MK2. O efeito combinado de DBAn e Bz, causou uma notável redução na viabilidade celular em formas epimastigotas e tripomastigotas em concentrações $> 10 \mu\text{M}$. Em suma, este estudo mostrou características respeitáveis de DBAn contra a cepa Y de *T. cruzi*, que pode ser desenvolvida em uma molécula líder para o tratamento da Doença de Chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*; Doença de Chagas; Derivados da Curcumina; Morte celular; Sinergismo.

ABSTRACT

Chagas Disease (CD), transmitted by *T. cruzi*, is considered a neglected disease and is still a major public health problem. The main drug available for treatment is benznidazole, which has serious adverse reactions and little efficacy in the chronic phase of CD. Therefore, this study was designed to investigate the potential therapeutic effect of the synthetic curcuminoid derivative (1E,4E)-1,5-bis(4-methoxyphenyl) penta-1,4-dien-3-one (DBAn) against *T. cruzi* strain Y using *in vitro* and *in silico* models. Initially, a cytotoxicity test was carried out in which the treatment of LLC-MK2 cells with DBAn showed a CC_{50} of 1277 ± 348 , as well as a selectivity index of 36, demonstrating a value 15 times higher than benznidazole. In addition, the curcuminoid derivative showed inhibitory activity in all three life stages of *T. cruzi*. In epimastigote forms, DBAn showed an IC_{50} of $61.81 \pm 0.83 \mu\text{M}$, with significant values between concentrations 62.5 - 1000 μM . At these same concentrations, DBAn showed an LC_{50} of $35.46 \pm 0.23 \mu\text{M}$ in trypomastigote forms. In the intracellular and replicative forms of *T. cruzi*, DBAn was able to decrease the number of infected cells as well as the number of amastigotes at all the concentrations tested: 15.6, 31.2 and 62.5 μM . In flow cytometry assays, DBAn was able to induce the production of ROS (DCFH2-DA); as well as changes in mitochondrial membrane potential (Rho123 - $\Delta\Psi\text{m}$); cell death inducing pathways were also analyzed, such as necrosis (7-AAD) and apoptosis (Ax/PE), where the curcuminoid derivative induced significant cell death events in the parasites. The *in silico* study allowed us to predict that DBAn is a liposoluble molecule with good oral bioavailability. In molecular docking, our results showed interactions between DBAn and the key enzymes of *T. cruzi* (GAPDH, Trypanothione Reductase, Cruzaine). An increase in affinity energy values (ΔG) was observed compared to Bz. Synergism tests between DBAn and Bz showed no cytotoxicity in LLC-MK2 cells. The combined effect of DBAn and Bz caused a notable reduction in cell viability in epimastigote and trypomastigote forms at doses $> 10 \mu\text{M}$. In summary, this study has shown respectable characteristics of DBAn against the Y strain of *T. cruzi*, which can be developed into a leading molecule for the treatment of Chagas disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*; Chagas disease; Curcumin Derivate; Cell death; Synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição dos casos de Doença de Chagas notificados à OMS, em todo o mundo, 2006-2019.....	20
Figura 2 - Estratificação dos municípios cearenses conforme o risco de transmissão vetorial da Doença de Chagas.....	21
Figura 3 - Morfologia das três formas de vida do <i>T. cruzi</i>	24
Figura 4 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
Figura 5 - Distribuição geral das DTUs (TcI-TcVI e Tcbat) nas Américas.....	28
Figura 6 - Resposta imune na evolução clínica da Doença de Chagas.....	30
Figura 7 - Tempo para diagnóstico da Doença de Chagas e progressão do estado clínico.....	32
Figura 8 - Estrutura química dos fármacos existentes para a terapia da Doença de Chagas, Benznidazol (A) e Nifurtimox (B).....	33
Figura 9 - Mecanismo de ação proposto do Benznidazol e Nifurtimox.....	34
Figura 10 - Estrutura 3D da GAPDH do <i>T. cruzi</i> (A). Reação catalisada pela GAPDH(B).....	36
Figura 11 - Estrutura 3D da cruzaina do <i>T. cruzi</i>	37
Figura 12 - Estrutura 3D da TR do <i>T. cruzi</i> (A). Reação catalisada pela TR (B).....	38
Figura 13 - Estrutura química da curcumina e derivados curcuminóides naturais.....	39
Figura 14 - Locais de reatividade química na curcumina que contribuem para sua atividade.....	40
Figura 15 - Reação para a síntese do DBAn.....	47
Figura 16 - Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em células LLC-MK2.....	53
Figura 17 - Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	55
Figura 18 - Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	56
Figura 19 - Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>	57

Figura 20 - Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio por formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	59
Figura 21 - Ensaio de avaliação de potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	60
Figura 22 - Representação esquemática do ensaio do potencial necrótico/apoptótico do DBAn sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	62
Figura 23 - Representação esquemática do ensaio de Sinergismos DBAn + Bz em células LLC-MK2.....	64
Figura 24 - Representação esquemática do ensaio de Sinergismos DBAn + Bz em formas tripomastigotas.....	65
Figura 25 - Complexo de interação da enzima TcGAPDH com os ligantes e interações do ligante DBAn com o receptor.....	69
Figura 26 - Complexo de interação da enzima TcTR com os ligantes e interações do ligante DBAn com o receptor.....	71
Figura 27 - Complexo de interação da enzima TcCr com os ligantes e interações do ligante DBAn com o receptor.....	72
Figura 28 - Citotoxicidade do DBAn (A) e Bz (B) sobre a viabilidade de células LLC-MK2, após 24h de tratamento.....	75
Figura 29 - Efeito citotóxico do DBAn (A) e Bz (B) sobre a forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> após 72h de tratamento.....	70
Figura 30 - Efeito citotóxico do DBAn (A) e Bz (B) sobre a forma tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h de tratamento.....	77
Figura 31 - Efeito citotóxico do DBAn (A) e Bz (B) sobre a forma amastigota de <i>T. cruzi</i> após 24h de tratamento.....	79
Figura 32 - Histograma da intensidade de fluorescência (FL1) após marcação com DCF-DA nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento com DBAn.....	81
Figura 33 - Avaliação da produção de espécies reativas citoplasmáticas em epimastigotas por citometria de fluxo pelo DBAn.....	81

Figura 34 - Histograma da intensidade de fluorescência (FL2) após marcação com Rho-123 nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24 horas de tratamento com DBAn.....	82
Figura 35 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 24h de tratamento com DBAn.....	83
Figura 36 - Avaliação do mecanismo de morte celular do DBAn por apoptose e/ou necrose marcado por 7-AAD/Anexina V na cultura de formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	84
Figura 37 - Gráfico Density-plot do perfil necrótico/apoptótico induzido por DBAn, analisado por citometria de fluxo.....	85
Figura 38 - Interações sinérgicas entre DBAn e Bz em células LLC-MK2.....	87
Figura 39 - Interações sinérgicas entre DBAn e Bz em formas epimastigotas.....	89
Figura 40 - Interações sinérgicas entre DBAn e Bz em formas epimastigotas.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros da caixa de grade para encaixe para as enzimas TcTR, TcGAPDH e TcCr.....	50
Tabela 2 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C do curcuminóide (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn) em CDCl ₃ . Os deslocamentos químicos em δ_C e δ_H estão em ppm.....	67
Tabela 3 - Dados de energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pela molécula DBAn com as enzimas TcCr, TcGAPDH e TcTR.....	68
Tabela 4 - Interações entre a DBAn, Bz e BRZ com TcGAPDH.....	70
Tabela 5 - Interações entre a DBAn, Bz e QUM com TcTR.....	71
Tabela 6 - Interações entre a DBAn, Bz e KB2 com TcCr.....	72
Tabela 7 - Propriedades físico-químicas calculadas do DBAn e Bz.....	73
Tabela 8 - Propriedades ADMET do DBAn.....	74
Tabela 9 - Relação da atividade do DBAn x Bz.....	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD - Amino actinomicina D

$\Delta\Psi_m$ – Potencial transmembrânico mitocondrial

ΔG - Energia de Afinidade

Å - Angstrom

ADMET: absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade

ALA - Alanina

AMES - ensaio da capacidade de um composto químico para induzir mutações no DNA

ARG - Arginina

ASP - Aspartato

ASN - Asparagina

ATP - Trifosfato de adenosina

ATR - Reflexão Total Atenuada

Ax/PE - Anexina V marcada com ficoeritrina

BHE - Barreira Hematoencefálica

BMC - Bisdemetoxicurcumina

BOD - Biochemical Oxygen Demand

Bz - Benznidazol

BZR - 6-(1,1-dimethylallyl)-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydro-7h-furo[3,2-g]

chromen-7-one

Caco-2 - Permeabilidade Caco-2(log Papp em 10^{-6} cm/s)

CC₅₀ - Concentração capaz de causar citotoxicidade em 50% das células

CG-EM - Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas

Cur - Curcumina

CYS – Cisteína

DBAn - DBAnnisaldeído

DC - Doença de Chagas

DCF - Forma oxidada de 2'-7'-diclorofluoresceína

DCFH - Forma reduzida de 2'-7'-diclorofluoresceína

DCFH₂-DA - Diacetato de 2'-7'-diclorofluoresceína

DMC - Demetoxicurcumina

DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTNs - Doenças Tropicais Negligenciadas

DTUs - Unidades de Tipagem Discreta

DL: Dose letal

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid

ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FADH₂ - Dinucleotídeo de flavina e adenina

FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GLU – Ácido glutâmico

GLN - Glutamina

GLY – Glicina

GR - Glutathione Redutase

GSH - Glutathione reduzida

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

hERG - Gene Humano, ether-a-go-go

hePG2 - Linhagem de células de câncer hepático humano

HIS - Histidina

IC₅₀ - Concentração capaz de inibir o crescimento de 50% de epimastigotas

IFR - Intensidade relativa de fluorescência

ILE - Isoleucina

IS – Índice de seletividade;

Kp - Constante de permeabilidade

KB2 - (3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimethyl-1-[(quinolin-6-ylmethyl)amino]propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)heptan-2-one

LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará

LAFEPE - Laboratório Farmacêutico de Pernambuco

LC₅₀ - Concentração capaz de matar 50% de tripomastigotas

LIT - Liver Infusion Triptose

LLC-MK2 - Células epiteliais renais de macaco

LOAEL - Nível de efeito adverso mais baixo observado

miLogP: Coeficiente de partição octanol-água

MM: Massa Molecular

MTT – Brometo de 3-(4,5-Dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio;

NAD⁺ - Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidada

NADPH - Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida

nALH - número de grupos aceptores de ligação hidrogênio

nDLH - número de grupos doadores de ligação hidrogênio

Nx - Nifurtimox

NK - Natural Killer

Papp: Coeficiente de permeabilidade aparente

PAMPs - padrões moleculares associados a patógenos

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PDB - Protein Data Bank

PHE – Fenilalanina

PRO - Prolina

PS - Área de Permeabilidade de Superfície

QUM - Mostarda quinacrina inibidora da enzima tripanotiona redutase de *T. cruzi*

Rho123 - Rodamina 123

RNA - Ácido ribonucleico

RPM - Rotações por minuto

RMN - Ressonância Magnética Nuclear

RMSD - Desvio Quadrático Médio

SBF - Soro bovino fetal

SDS - Dodecilsulfato de sódio

SER - Serina

SNC: Sistema Nervoso Central

OCT2: Transportador de Cátions Orgânicos

OMS - Organização Mundial de Saúde

T(SH)2 - Tripanotiona

TC - *Trypanosoma cruzi*

TcCr - Cruzaina do *T. cruzi*

TcGAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase específica de *T. cruzi*

TcTR - Tripanotiona Redutase do *T. cruzi*

THR - Treonina

TLR - Receptores do tipo Toll

TPSA - Área de superfície polar topológica.

TR - Tripanotiona redutase

TRP - Triptofano

TYR – Tirosina

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO	19
1.1	Epidemiologia da doença de Chagas	19
1.2	Doença de Chagas	22
1.2.1	Transmissão da doença de Chagas.....	22
1.2.2	Vias alternativas de transmissão.....	23
1.3	<i>Trypanosoma cruzi</i>	24
1.3.1	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	25
1.3.2	Variabilidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.4	Resposta imune na doença de Chagas	29
1.5	Progressão clínica da doença de Chagas	31
1.6	Terapia medicamentosa da doença de Chagas	33
1.7	Desenvolvimento de novos fármacos contra <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
1.8	Enzimas alvos do <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
1.8.1	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH).....	36
1.8.2	Cruzaína.....	37
1.8.3	Tripanotiona redutase.....	37
1.9	Curcuminóides	38
2.	JUSTIFICATIVA	42
3.	OBJETIVOS	
3.1	Objetivo geral	45
3.2	Objetivos específicos	45
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	46
4.1	Síntese e caracterização química do derivado curcuminóide	47
4.2	Docking molecular	48
4.3	Parâmetros farmacocinéticos	51
4.4	Avaliação da citotoxicidade do DBAn em células hospedeiras	52
4.5	Ensaio de atividade antiparasitária e mecanismo de ação <i>in vitro</i>	54
4.5.1.	Epimastigotas.....	54

4.5.2.	Tripomastigotas.....	55
4.5.3.	Amastigotas.....	57
4.6	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	58
4.7	Avaliação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial.....	59
4.8	Quantificação de células necróticas e apoptóticas.....	61
4.9	Ensaio das atividades sinérgicas com DBAn + Bz <i>in vitro</i>.....	62
4.9.1	Sinergismos DBAn + Bz em células LLC-MK2.....	63
4.9.2	Sinergismos DBAn + Bz em formas epimastigotas.....	64
4.9.3	Sinergismos DBAn + Bz em formas tripomastigotas.....	64
4.10	Análise estatística.....	66
5.	RESULTADOS.....	67
5.1	Determinação estrutural da molécula (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn).....	67
5.2	Docking molecular.....	68
5.3	Parâmetros farmacocinéticos.....	73
5.4	Avaliação da citotoxicidade da DBAn em células hospedeiras.....	75
5.5	Avaliação da atividade da DBAn em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	76
5.6	Avaliação da atividade da DBAn em formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	77
5.7	Relação da atividade do DBAn x Bz sobre as formas tripomastigotas e epimastigotas do <i>T. cruzi</i> e em células LLC-MK2.....	78
5.8	Avaliação da atividade do DBAn sobre as formas amastigotas de <i>T. cruzi</i>.....	79
5.9	Ensaio de citometria de fluxo.....	80
5.9.1	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> pelo DBAn.....	80
5.9.2	Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> pelo DBAn.....	82
5.9.3	Avaliação do potencial necrótico/apoptótico em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> pelo DBAn.....	83
5.10	Avaliação da atividade sinérgica entre DBAn + Bz.....	86
5.10.1	Interações sinérgicas entre DBAn e Bz em células LLC-MK2.....	86
5.10.2	Avaliação da atividade sinérgica com DBAn + Bz em formas epimastigotas.....	88

5.10.3	Avaliação da atividade sinérgica com DBAn + Bz em formas tripomastigotas...	88
6.	DISCUSSÃO	92
7.	CONCLUSÃO	105
8.	REFERÊNCIAS	107

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Epidemiologia da Doença de Chagas

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN) são causadas por agentes infecciosos endêmicos, principalmente em países subdesenvolvidos. Uma doença é considerada negligenciada quando existe pouco investimento no desenvolvimento de novos fármacos, vacinas, métodos diagnósticos e ineficácia de programas de controle. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelam que mais de um bilhão de pessoas estejam acometidas por alguma dessas doenças, predominantemente em regiões tropicais e áreas subtropicais entre as populações mais vulneráveis e marginalizadas (OMS, 2020; ENGELS; ZHOU, 2020).

No início do ano de 2021, a OMS lançou um roteiro para as DTNs para o período de 2021-2030. Esse documento tem como objetivo a prevenção, controle, eliminação ou erradicação desse grupo de vinte doenças, entre elas a Doença de Chagas (DC). Apesar dos avanços dos últimos anos, essas doenças ainda persistem, tornando-se um problema global na saúde pública e conseqüentemente sobre o desenvolvimento social e econômico (OMS, 2020).

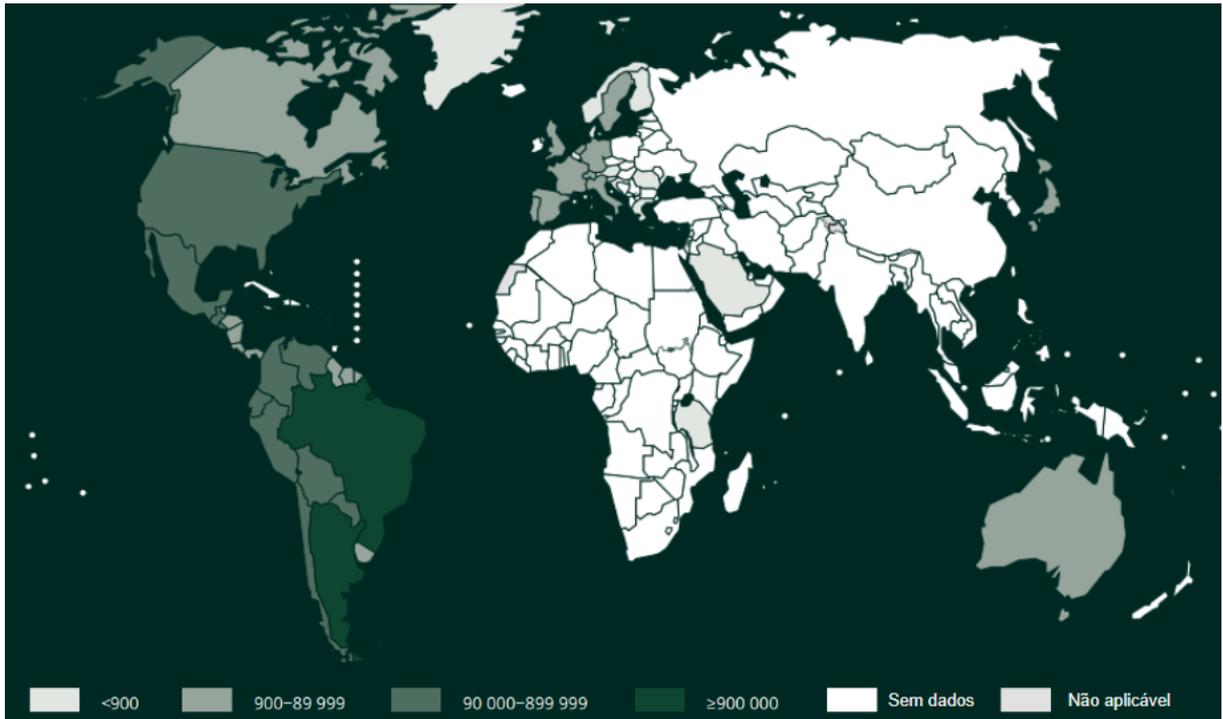
A doença de Chagas faz parte do grupo das DTN's, sendo considerada um grande problema mundial por causar um grande impacto na saúde pública, principalmente em países da América Latina. O aumento de casos de DC nas últimas décadas está relacionado com a migração populacional entre a América Latina e os demais países ao redor do mundo. A DC deixou de ser uma doença endêmica, restrita a áreas rurais para se tornar uma doença de caráter urbano (MILLS, 2020). A crescente urbanização juntamente com a mobilidade populacional possibilitou a entrada do agente causador da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (TC), em diferentes regiões geográficas, além da possibilidade de novos meios de transmissão além da vetorial, como por exemplo transfusão sanguínea, transplante de órgãos e por via congênita (COURA, 2015).

Após um século de sua descoberta, a DC continua sendo um problema de saúde pública. Apesar disso, muitos países possuem estratégias para controle e prevenção na tentativa de reduzir o número de casos de doença de Chagas, porém não conseguiram atingir todas as metas propostas (OMS, 2022).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2023), estima-se que aproximadamente 6 a 7 milhões de pessoas possam estar com DC no mundo, sendo mais disseminada em áreas endêmicas em 21 países do continente americano: Argentina, Belize,

Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (CHUIT *et al.*, 2019; PÉRES-MOLINA, 2018). A Figura 1 mostra a distribuição global de casos de DC, no período de 2006-2019 (OMS, 2020).

Figura 1 - Distribuição dos casos da doença de Chagas notificados à OMS, em todo o mundo, 2006-2019.



Fonte: Adaptado de OMS, 2020.

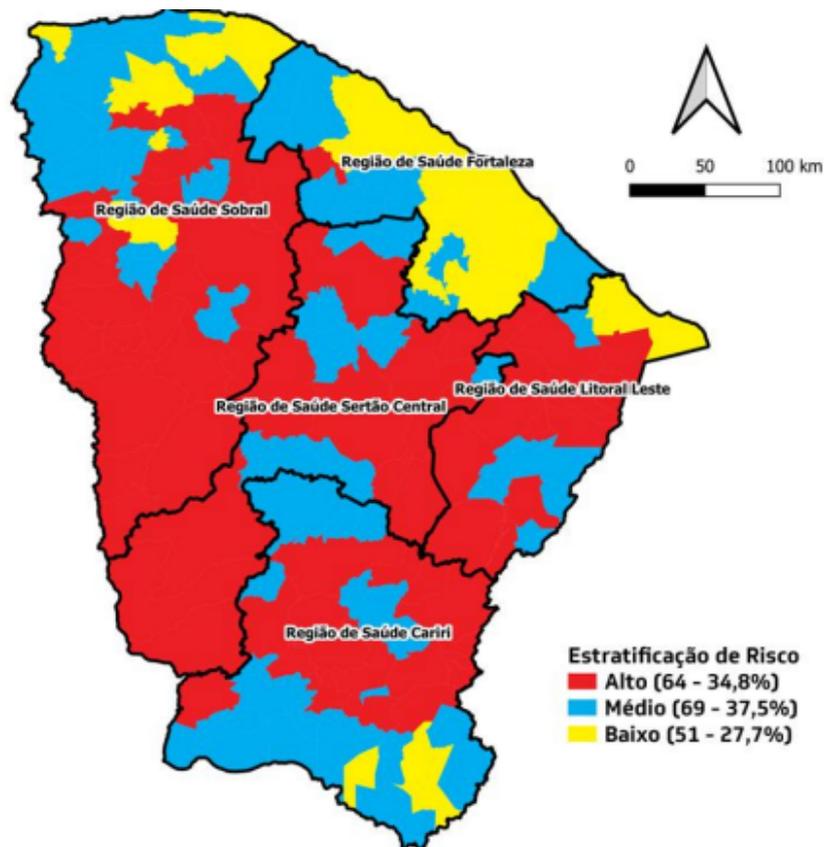
No continente americano, a DC apresenta uma incidência anual média de 30.000 novos casos, 12.000 mortes por ano e 8.000 recém-nascidos infectados durante a gestação. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas nas Américas vivem em áreas de exposição e correm o risco de contrair esta doença, ocasionando cerca de 7.000 óbitos por ano na América Latina (PAHO, 2022).

Estima-se que haja no Brasil, pelo menos um milhão de pessoas infectadas pelo vetor causador da DC, *Trypanosoma cruzi* (TC). Em 2020, entre os meses de março e agosto, foram registrados 1.746 óbitos, tendo como causa básica a DC, predominando nas regiões Sudeste e Nordeste. Ainda no mesmo ano, a região Norte do Brasil apresentou a maior taxa de

incidência da DC, confirmados 146 novos casos, com uma letalidade de 2% (3/146) (BRASIL, 2021).

O estado do Ceará registrou, entre os anos de 2015 - 2020, 1.062 amostras positivas para DC. De acordo com Laboratório Central de Saúde Pública do estado do Ceará (LACEN), essa positividade variou 3%. Foram registrados, no mesmo período, 326 óbitos (CEARÁ, 2021). Apesar dos números de casos estarem diminuindo, ainda existe o risco de transmissão vetorial da DC nos municípios cearenses, por apresentar uma vasta cobertura vegetal e uma área rural com habitações e condições sanitárias bastante precárias, propiciando o aparecimento do vetor da DC. A figura 2 mostra a estratificação de risco para DC dos municípios cearenses (CAVALCANTI *et. al.*, 2009; CEARÁ, 2021).

Figura 2 - Estratificação dos municípios cearenses conforme o risco de transmissão vetorial da doença de Chagas.



Fonte: Boletim das Doenças Tropicais Negligenciadas (CEARÁ, 2021).

1.2 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana foi descrita pela primeira vez em 1909 pelo médico brasileiro e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1878-1934), ganhando um importante destaque na história da medicina, sendo considerada uma descoberta inédita com a identificação do vetor, do parasito causador da doença, do hospedeiro, quadro clínico da doença, descrevendo também aspectos epidemiológicos e o impacto dessa doença em seres humanos (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

1.2.1 Transmissão da doença de Chagas

O agente causador da DC, *Trypanosoma cruzi* (TC), é um protozoário hemoflagelado pertencente a seguinte classificação taxonômica: domínio Eukarya, reino Protista, sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, classe Zoomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* subgênero Schizotrypanum e espécie *T. cruzi* (MOMEN, 1999).

O *T. cruzi* é transmitido principalmente pelo inseto triatomíneo, popularmente conhecido pelo nome de barbeiro. Tem como habitat natural o ambiente silvestre, porém devido ao desmatamento foi possível sua disseminação podendo ser encontrado também em ambiente peridomiciliar e domiciliar, principalmente em casas ou cabanas de pau-a-pique. Esses insetos são hematófagos, possuem hábitos noturnos e sua vida média é de dois anos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

As espécies de triatomíneos que transmitem o *T. cruzi* incluem: *Panstrongylus megistus*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata*, *Triatoma barberi*, *Triatoma infestans*, sendo este último a espécie mais importante da América do Sul e *Triatoma brasiliensis*, encontrado normalmente no Brasil (RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). Durante muitos séculos, esses vetores foram responsáveis por transmitir o parasito para diversas outras espécies como marsupiais, roedores e primatas (COURA; VIÑAS, 2010). Em um estudo realizado nos cinco biomas brasileiros, entre 1992 e 2017, constataram alta parasitemia de *T. cruzi* no quati *Nasua nasua*, em algumas espécies de gambás, no macaco-prego: *Sapajus libidinosus* e no mico-leão-dourado: *Leontopithecus rosalia* (JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018).

1.2.2 Vias alternativas de transmissão

Com o processo de urbanização, apareceram novas formas de transmissão da DC, como por exemplo a transmissão por transfusão sanguínea. Assim, em 1969, foi instituída a obrigatoriedade da triagem sorológica para doença de Chagas nos bancos de sangue do Brasil (BRASIL, 2011). Outra necessidade está no controle de transplante de órgãos, como também a inclusão de um diagnóstico diferencial e tratamento específico para a DC (CONNERS *et al.*, 2016). A via transfusional é dependente de vários fatores, como a presença do parasito no sangue, estado imunológico do receptor, além da cobertura da triagem e da sensibilidade dos testes sorológicos (COURA, 2015).

Outras formas de transmissão também já foram relatadas: transmissão congênita (transmissão do tipo vertical da mãe chagásica para o filho durante a gravidez) (KLEIN *et al.*, 2020); coinfeção pelo TC por portadores de HIV (GUIDETTO *et al.*, 2019); de forma acidental, durante a manipulação em laboratórios e por doador infectado durante transplante de órgãos (COURA, 2015). Ainda existe a possibilidade de transmissão do TC pela via sexual, sendo já descrita em camundongos e em humanos (GOMES *et al.*, 2019).

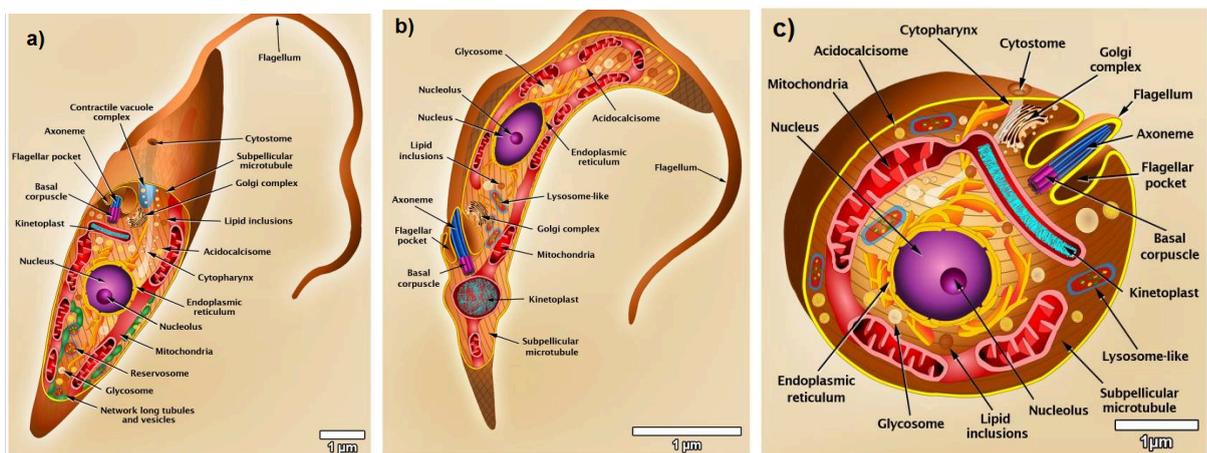
Devido a urbanização e ao desmatamento, houve um maior contato dos humanos com os insetos transmissores da doença de Chagas alterando a distribuição das espécies de triatomíneos, aumentando o risco de transmissão por via oral (ALARCON DE NOYA; NOYA GONZÁLES, 2019). Acredita-se que a transmissão oral deve-se à ingestão de líquidos ou alimentos contaminados como açaí, sucos e caldo de cana. Essa contaminação pode ser através das fezes de barbeiros ou pela presença de vetor contaminado, durante o preparo desses alimentos (FILIGHEDDU; GÓRGOLAS; RAMOS, 2017; VELÁSQUEZ-ORTIZ, 2020).

Um estudo de revisão sistemática em publicações de 1968 a 31 de janeiro de 2018, relatou a ocorrência de 2.470 casos de infecção oral da DC aguda na América Latina, sendo 2.040 desses casos somente no Brasil (BRUNETO *et al.*, 2021). Em 2015, o Ministério da Saúde publicou uma série histórica sobre a DC no Brasil, compreendendo o período de 2000 a 2013, onde a forma de transmissão oral foi a mais frequente correspondendo a 68,9%, seguida pela transmissão vetorial (6,4%) dos casos de DC (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Em 2006 foi notificado e confirmado no município de Redenção, no Ceará, o primeiro caso de contaminação por vir oral em 8 indivíduos de uma mesma família (CAVALCANTI *et al.*, 2009).

1.3 *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui três formas de vida de acordo com seu estágio de desenvolvimento: epimastigota, tripomastigota e amastigota. Suas diferenças compreendem alterações morfológicas, metabólicas e na expressão gênica. A forma epimastigota é encontrada no intestino do inseto vetor, sendo a forma de multiplicação extracelular, enquanto a tripomastigota caracteriza-se por ser a forma infectante, presente no inseto vetor (tripomastigotas metacíclica) e no hospedeiro vertebrado (tripomastigota sanguínea). A forma amastigota é encontrada no interior das células do hospedeiro vertebrado (Figura 3) (LOPES *et al.*, 2010; PÉREZ-MAZLIAH, 2021).

Figura 3 - Morfologia das três formas de vida do *T. cruzi*.



Legenda: (a) epimastigotas; (b) tripomastigotas e (c) amastigotas. Imagens com base em micrografias de microscopia eletrônica de varredura e transmissão.

Fonte: Adaptado de TEIXEIRA *et al.*, 2012.

Outras formas de vida do *T. cruzi* foram observadas de forma transitória entre seus estágios evolutivos: A esferomastigota presente no intestino do inseto, a epimastigote-like presente no citoplasma das células infectadas do hospedeiro vertebrado e ainda duas formas diferentes de tripomastigotas: delgada e larga, ambas presentes no sangue periférico dos mamíferos (ALMEIDA-DE-FARIA *et al.*, 1999; TYLER; ENGMAN, 2001).

A superfície celular dos tripanossomatídeos pode ser considerada composta por três estruturas: o glicocálice, a bicamada lipídica e os microtúbulos subpeliculares. Além dessas estão distribuídas ao longo da membrana proteínas tais como, transialidase, mucinas e a

família Tc85. Possuem um único flagelo cuja função é permitir o movimento da célula e fixação do protozoário à superfície das células do hospedeiro vertebrado. Formados por 9 pares de microtúbulos periféricos e um par central que surgem de uma invaginação da membrana plasmática. Em seu núcleo possui uma cromatina dispersa, um nucléolo localizado centralmente, e ainda durante a mitose há o aparecimento de pequenas placas densas, sendo 10 no *T. cruzi* (SOUZA, 2009; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2019).

O parasito possui uma estrutura dentro de sua mitocôndria denominada cinetoplasto, formado pela condensação de DNA extranuclear (K-DNA), podendo chegar a 10 a 15% do DNA total da célula. O cinetoplasto é organizado por genes que formam estruturas moleculares chamadas de maxcírculos e minicírculos. Esses minicírculos codificam pequenos RNAs guias (RNAg) importante no processo de transcrição realizado a partir dos maxcírculos. A importância desses minicírculos reside na capacidade de agir como um fator mutagênico ao se incorporar ao genoma do hospedeiro (JUNQUEIRA *et al.*, 2005; CALLEJAS-HERNÁNDEZ, 2021).

O glicosomo presente no *T. cruzi* é uma organela importante por armazenar enzimas importantes da via glicolítica (QUIÑONES *et al.*, 2020). Também possuem uma organela ácida denominada de acidocalcisomas, relacionadas aos lisossomos ricas em polifosfato, são as principais reservas intracelulares de Ca^{2+} (DO CAMPO; HUANG, 2021). Os reservossomos são estruturas localizadas na parte posterior do *T. cruzi*, mais predominante nas formas epimastigotas, cuja função é armazenar e degradar moléculas oriundas do processo de endocitose (LOSINNO *et al.*, 2021). O complexo formado pelo complexo de golgi e retículo endoplasmático presente no *T. cruzi*, constituem um alvo importante para diversas drogas anti-chagásicas resultando em alterações em sua estrutura. Outras estruturas presentes no *T. cruzi* podem ser compartilhadas com os demais seres eucariotos (ZUMA *et al.*, 2021).

1.3.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

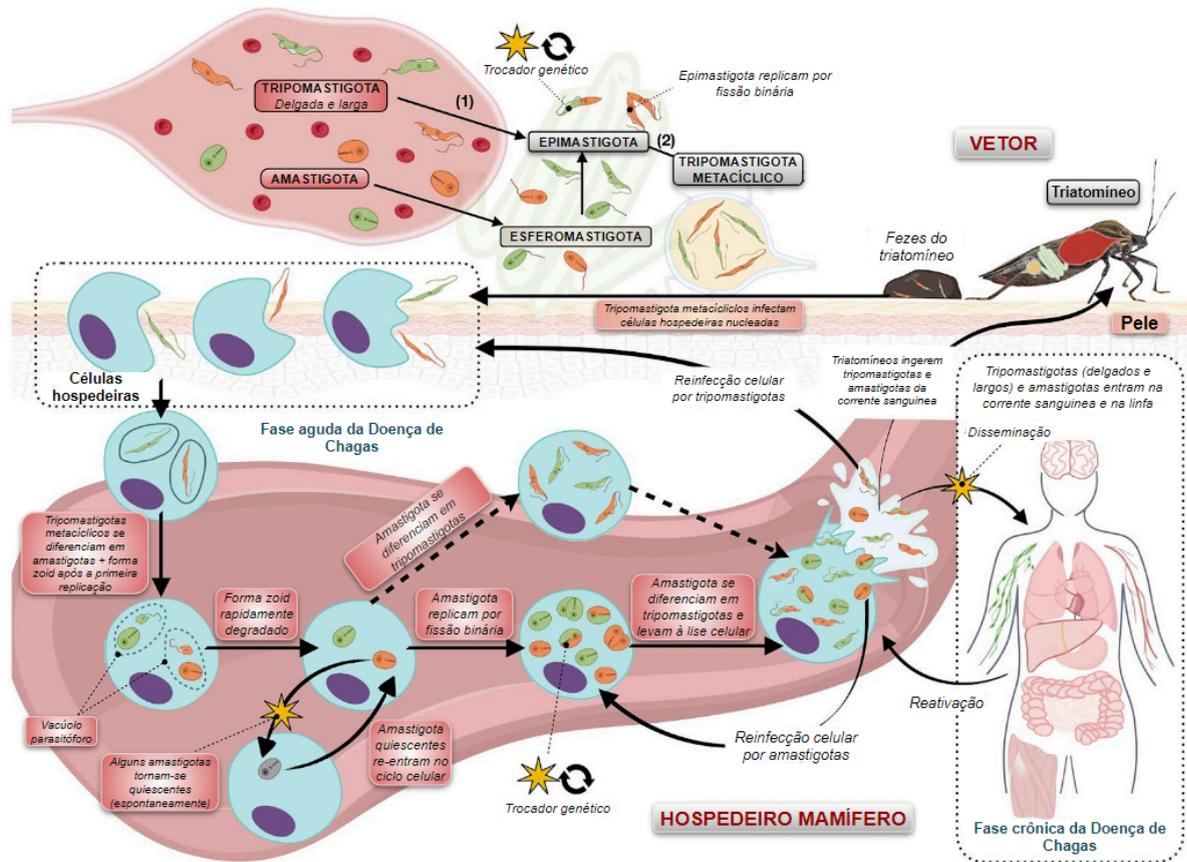
O *T. cruzi* possui um ciclo de vida bastante complexo, abrangendo uma fase que ocorre no vetor e outra que ocorre no hospedeiro. A fase que ocorre no inseto triatomíneo se inicia quando ao picar o hospedeiro infectado, ingere formas tripomastigotas presentes no sangue circulante. Ao chegar no intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se diferenciam em formas epimastigotas por fissão binária, em seguida migram para o intestino posterior e o reto onde se transformam em formas tripomastigotas metacíclicas, as quais são

liberadas nas excretas desses insetos. Essa forma infectante pode ser inoculada durante o repasto sanguíneo no hospedeiro através de lesão ou injúria na pele ou mucosas íntegras (RASSI Jr; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; PÉREZ-MAZLIAH, 2020).

A fase no hospedeiro começa quando ao coçar a região próxima onde ocorreu a deposição dos excrementos juntamente das formas tripomastigotas metacíclicas, estas acessam mais facilmente a circulação sanguínea e infectam células-alvo, onde completam sua diferenciação em formas amastigota. Após a replicação intracelular por fissão binária, a forma amastigota se diferencia em tripomastigotas lizando a célula infectada, em seguida essas formas podem invadir tecidos vizinhos ou se disseminar pela corrente sanguínea ou linfática infectando tecidos e órgãos mais distantes (RASSI Jr; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; PÉREZ-MAZLIAH, 2020).

Um artigo revisou o ciclo celular do *T. cruzi*, mostrando outras formas morfológicas, além das formas tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas. Ainda no triatomíneo, formas amastigotas presentes no intestino do vetor, diferenciam-se em formas esferomastigotas que se transformam em epimastigotas. No hospedeiro mamífero, amastigotas podem se tornar metabolicamente quiescentes, o qual pode permanecer por um longo período em tecidos infectados, retornando ao ciclo celular posteriormente restabelecendo a infecção. Formas tripomastigotas podem apresentar duas morfologias: delgada, sendo mais infecciosa determinando parasitemia mais precoce e a forma larga que, apesar de ser menos infecciosa, são mais resistentes a anticorpos. Outra morfologia chamada zoid, consiste na diferenciação dos tripomastigotas metacíclicos resultando em amastigotas e um zoid que é degradada rapidamente pela célula hospedeira, envolto um vacúolo parasitóforo (Figura 4) (MARTÍN-ESCOLANO *et al.*, 2022).

Mais especificamente, o momento fundamental da infecção pelo *T. cruzi* ocorre quando formas tripomastigotas invadem as células imunes do hospedeiro, desencadeando o fluxo de cálcio nessas células, ativando diversas vias de sinalização. Para que seja possível a invasão nessas células, o *T. cruzi* possui proteínas de superfície poliméricas ancoradas por glicosilfosfatidilinositol (GPI), como trans-sialidases, mucinas e outras, para que assim ocorra a ligação e a internalização na célula hospedeiras (CARDOSO; REIS-CUNHA; BARTHOLOMEU, 2016). Essas proteínas além de contribuírem para a proteção do *T. cruzi*, favorecem a persistência da infecção tanto no inseto vetor quanto no hospedeiro mamífero (BALOUZ *et al.*, 2019).

Figura 4 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

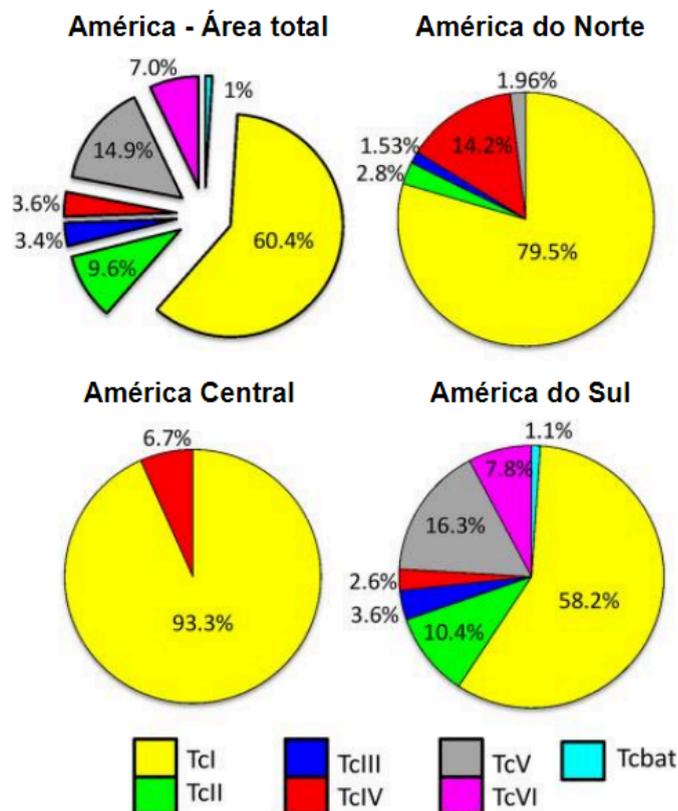
Fonte: Adaptado de (MARTÍN-ESCOLANO *et al.*, 2022).

1.3.2 Variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* possui diversas cepas circulantes na natureza, entre elas: Y, Sylvio X10 e CL Brener, sendo observada variabilidade genética entre elas (FRANZÉN *et al.*, 2011). Um dos critérios para caracterização dessas cepas, refere-se a unidades de tipagem discreta (DTUs). A última classificação publicada recomenda a caracterização do *T. cruzi* em sete (DTUs), TcI-TcVI e Tcbat, baseado em sua genotipagem. Com o estudo dessas DTUs é possível identificar a diversidade genética, o conhecimento populacional do *T. cruzi* e suas características epidemiológicas. Além disso, auxilia na identificação de fatores que possam ter um valor prognóstico na evolução da DC. Também é importante considerar essa variabilidade genética do *T. cruzi* durante a testagem de novos medicamentos antichagásicos (ZINGALES, 2018).

Em um estudo realizado em 2016 em mais de 6.000 cepas, mostrou a diversidade genética do *T. cruzi* mais próxima da realidade. Na figura 5 é possível observar a distribuição aproximada dos sete DTUs de *T. cruzi* amplamente distribuídos nas Américas. A cepa TcI foi mais prevalente em todo o continente americano (BRENIÈRE; WALECKX; BARNABÉ, 2016). Outro estudo realizado no Estado de Pernambuco, Brasil, caracterizou as DTUs de *T. cruzi* em triatomíneos, revelando 70,59% do genótipo TcI, detectado em todas as espécies de triatomíneos identificadas (SILVA *et al.*, 2022). Nielebock e colaboradores (2020), identificaram o genótipo TcII em 92,9 % dos pacientes brasileiros com doença de Chagas crônica, nascidos nas regiões Sudeste e Nordeste, associando-os a pacientes que evoluíram com insuficiência cardíaca ou parada cardíaca súbita.

Figura 5 - Distribuição geral das DTUs (TcI-TcVI e Tcbat) nas Américas.



Fonte: Adaptado de Brenière; Waleckx; Barnabé, 2016.

1.4 Resposta imune na doença de Chagas

A presença do *T. cruzi* ocasiona uma resposta imune inata no hospedeiro, com a estimulação dos receptores intracelulares tipo toll (TLRs) 7 e 9, seguidos pela produção de citocinas pró-inflamatórias: interferon- γ (IFN- γ), Interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Células da imunidade inata, macrófagos, células dendríticas e células Natural Killer (NK), são capazes de detectar e reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), através de receptores em sua superfície como as proteínas transmembrana denominadas de receptores do tipo Toll (TLR). Essas moléculas de superfície conseguem identificar moléculas no *T. cruzi* atuando como agonistas de receptores TLR, produzindo óxido nítrico, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias. Além disso, ocorre a resposta imune adaptativa, havendo participação de células T CD4⁺ e T CD8⁺ e produção de anticorpos pelos linfócitos B. Todas essas células da imunidade inata ou adaptativa podem favorecer a resistência do hospedeiro (RODRIGUES; OLIVEIRA; BELLIO, 2012; CARDILLO *et al.*, 2015).

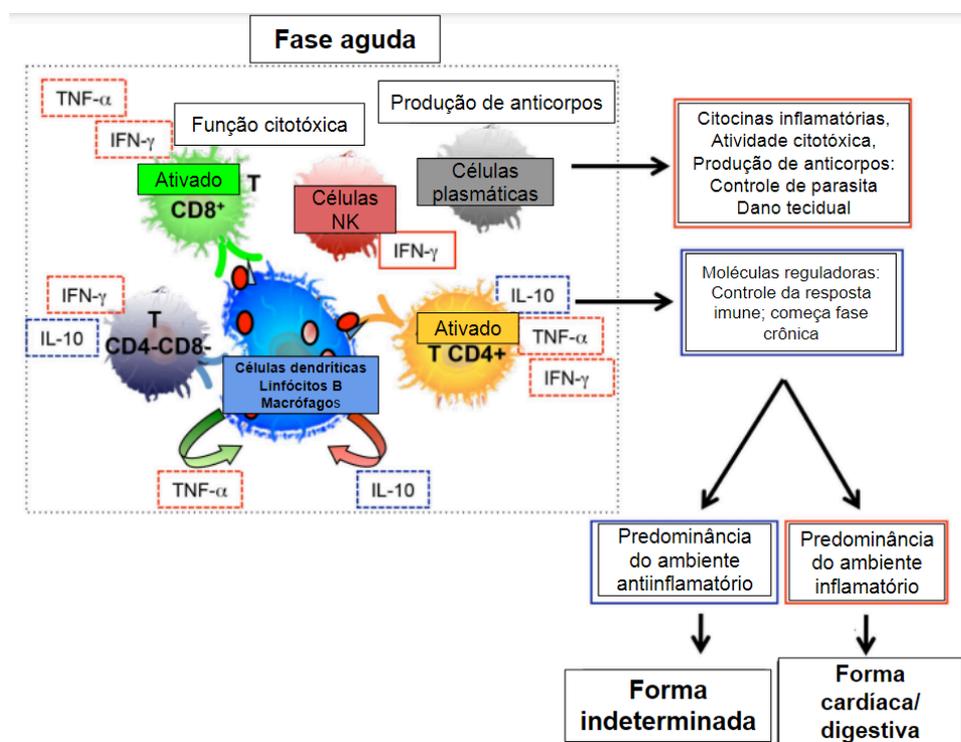
A infecção por *T. cruzi* provoca a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), produzidos por células fagocíticas como os macrófagos. Esses EROs ligam os sistemas imunológico inato e adaptativo, também são considerados reguladores críticos da produção de citocinas em resposta à infecção por *T. cruzi* (MACHADO *et al.*, 2012).

Durante a fase aguda da doença de Chagas humana, são ativadas células como macrófagos, células dendríticas e produção de anticorpos pelo linfócito B (plasmócitos). Essa ativação leva ao controle da parasitemia, vista nas fases tardias da fase aguda e ao longo da fase crônica. Essas células produzem citocinas que ativam células da imunidade adaptativa. A Interleucina 10 (IL-10) tem participação importante na expansão e ativação funcional das células T CD4⁺ e T CD8⁺ durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, diminuindo assim o dano tecidual e permitindo que a doença entre na fase crônica (Figura 6) (PINO-MARTINEZ *et al.*, 2019).

Apesar dessa resposta inicial ser possível o controle da parasitemia tecidual, o *T. cruzi* consegue escapar, não sendo eliminado totalmente, assim após um período de latência, a doença progride para a fase crônica da DC. Acredita-se que a persistência do *T. cruzi* e sua evasão do sistema imune ocorre devido a moléculas imunomoduladoras liberadas pelo próprio parasito, a variabilidade de seus antígenos de superfície, o mimetismo molecular e a

resistência ao sistema complemento (FLÁVIA; FREIRE-de-LIMA; MORROT, 2015). Esse ambiente inflamatório na fase crônica está associado à manutenção da forma indeterminada e às formas sintomáticas (cardíaca e digestiva) (ANDRADE, GOLLOB, DUTRA, 2014). Além disso, as formas infecciosas do *T. cruzi* (tripomastigota metacíclico e tripomastigota sanguíneo) apresentam diferenças na resposta imune durante a infecção (GUTIERREZ *et al.*, 2021).

Figura 6 - Resposta imune na evolução clínica da Doença de Chagas.



Fonte: Adaptado de Andrade, Gollob, Dutra, 2014.

Um estudo investigou a relação da resposta imune com diferentes tipos de cepas de *T. cruzi* (TcI, TcII ou TcVI). Os resultados mostraram que a cepa TcI apresentou baixos níveis de citocina nos estágios iniciais de infecção, com um leve aumento na fase tardia. Com a cepa TcII ocorreu o oposto. A cepa TcVI, apresentou um perfil intermediário. Esses dados demonstram a influência na resposta imune em diferentes genótipos do *T. cruzi* (DA SILVEIRA-LEMOS *et al.*, 2021).

1.5 Progressão clínica da doença de Chagas

A DC compreende uma fase aguda e uma fase crônica, com diversos sintomas clínicos relacionados de acordo com a evolução clínica da doença. Fatores como variabilidade genética, virulência e infecções mistas, associados ao parasito, assim como fatores socioambientais, estado imunológico, idade e sexo relacionado ao hospedeiro, podem influenciar o curso do desenvolvimento da doença (ZINGALES *et al.*, 2012; LEWIS *et al.*, 2016).

Na fase aguda ocorre o período de incubação do parasito, associado a uma alta parasitemia e invasão de diversos tecidos, juntamente associado a sintomas que podem persistir por até 90 dias. Apesar dessa fase ser geralmente assintomática, cerca de 30% dos casos podem desenvolver lesões em órgãos como coração, sistema digestivo e nervoso. Outros sintomas incluem: febre prolongada, mal-estar, inchaço do fígado, baço e linfonodos, edema subcutâneo localizado ou generalizado. Os sinais de porta de entrada da inoculação do *T. cruzi* pelo barbeiro na pele do homem, ocasionando o chagoma, caracterizado pelo eritema, inchaço e sinal de Romanã, é caracterizado como uma oftalmia unilateral com edema indolor das duas pálpebras (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; RASSI JR; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012). A principal causa de morte nessa fase se caracteriza pelo aparecimento de meningoencefalite e miocardite (BERN, 2015).

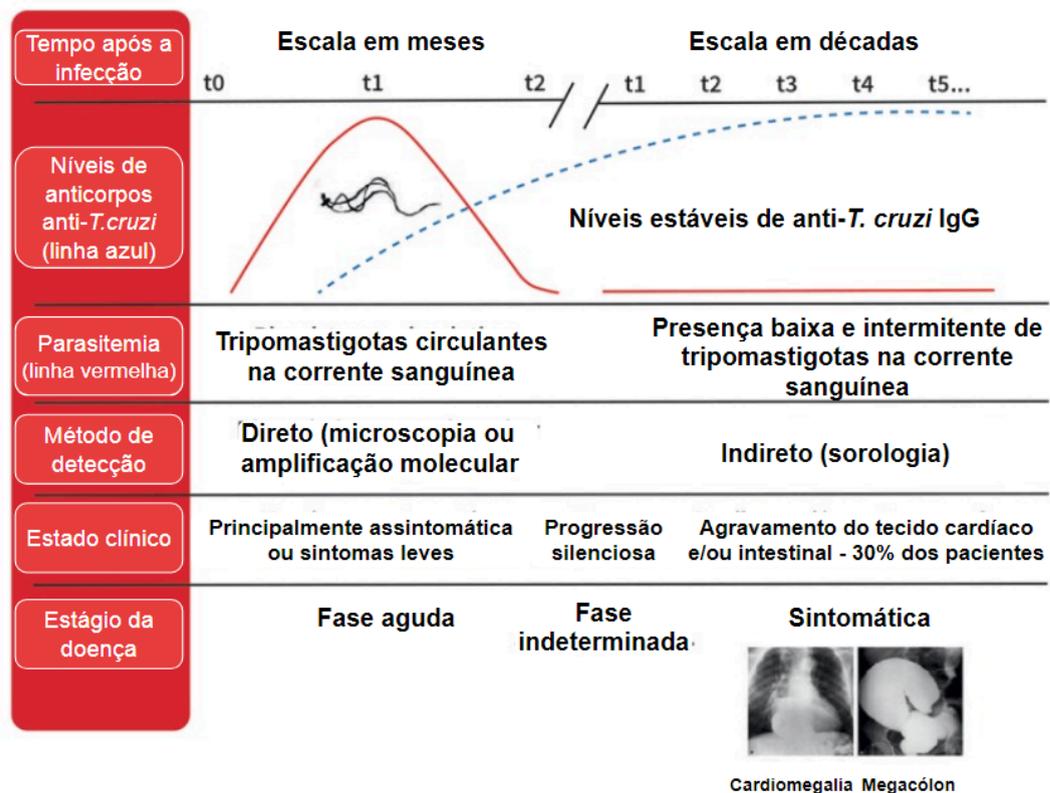
Após o término da fase aguda, os pacientes podem apresentar uma forma indeterminada da doença. Geralmente os pacientes acometidos são assintomáticos, com um bom prognóstico, requerendo um acompanhamento para evitar desenvolvimento da forma grave (HASSSLOCHER-MORENO *et al.*, 2021).

A fase crônica é caracterizada de acordo com as formas clínicas apresentadas e sintomas que aparecem após 10 a 30 anos do início da infecção. Na forma cardíaca pode ocorrer miocardite crônica, distúrbios no sistema de condução cardíaco (bloqueio intraventricular e atrioventricular, disfunção no nódulo sinusal e arritmia ventricular), causando instabilidade elétrica (arritmia atrial), redução da contratilidade (trombose intracavitária e insuficiência cardíaca) e distúrbios microvasculares que podem resultar em morte súbita. Alterações no sistema nervoso intracardíaco podem causar dor torácica atípica e também morte súbita (ECHAVARRÍA *et al.*, 2019). Pacientes que desenvolvem a forma digestiva apresentam dilatação do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e/ou megacólon). O comprometimento do esôfago inclui a perda do peristaltismo esofágico e falta de relaxamento do esfíncter inferior durante a deglutição, causando progressiva dilatação do órgão. A

disfunção esofágica pode ser associada com alterações no trânsito intestinal (DANTAS, 2021).

Durante a fase aguda da DC, o diagnóstico é feito através de exames parasitológicos: observação direta no sangue, hemocultura ou extensões sanguíneas coradas, devido à elevada parasitemia nessa fase. Para a fase crônica, utiliza-se testes sorológicos como ensaios de imunofluorescência, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) e ensaios de hemaglutinação indireta, para detecção de anticorpos IgG produzidos na presença de *T. cruzi* (RASSI, RASSI E MARCONDES DE REZENDE, 2012; SANCHEZ-VEGA *et al.*, 2020; ECHAVARRÍA *et al.*, 2020). O teste de PCR ou RT-PCR também é utilizado para auxiliar no diagnóstico quando a sorologia é considerada inconclusiva (Figura 7) (RAMÍREZ, 2019).

Figura 7 - Tempo para diagnóstico da Doença de Chagas e progressão do estado clínico.

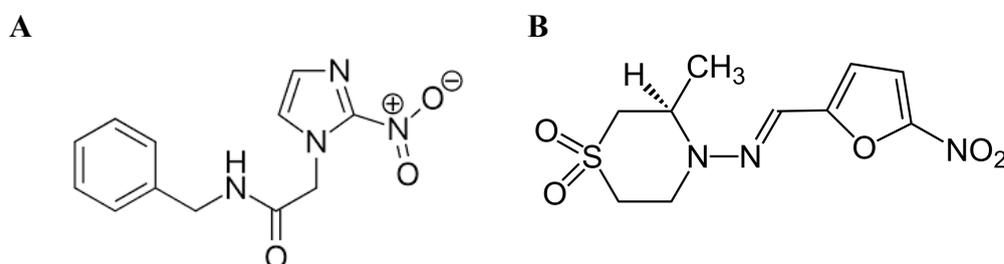


Fonte: Adaptado de (ECHAVARRÍA *et al.*, 2020).

1.6 Terapia medicamentosa da Doença de Chagas

Para o tratamento da DC, existem duas drogas, introduzidas nos anos 60 e 70, respectivamente: O nifurtimox (Nx) (3-metil-4(5'-nitrofurfurilideno-amino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido), lançado pela Bayer, e benznidazol (Bz) (N-benzil-2-nitroimidazol-acetamida) do laboratório Roche. Esses fármacos são compostos nitro-heterocíclicos, sendo o Nx com um grupo nitro ligado ao anel furano, enquanto o grupo nitro do Bz está ligado ao anel imidazol (Figura 8) (COURA, 2009; STERVEDING, 2014).

Figura 8 - Estrutura química dos fármacos existentes para a terapia da doença de Chagas, Benznidazol (A) e Nifurtimox (B).

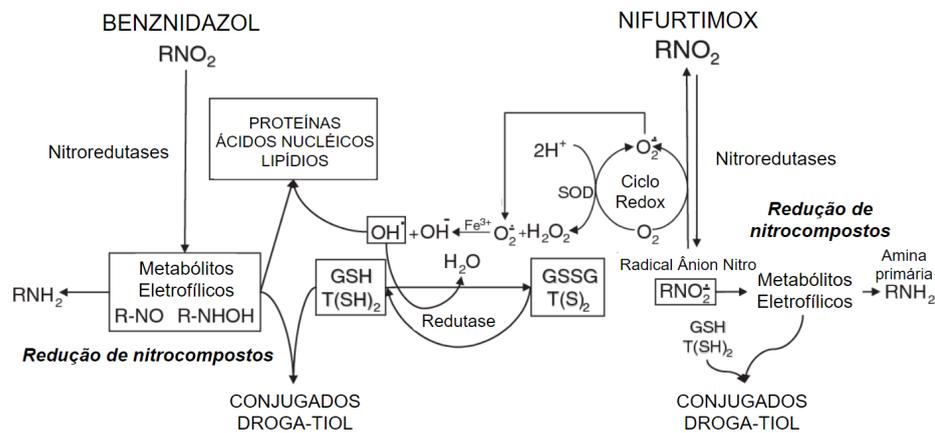


Fonte: STERVEDING, 2014

O Bz é o fármaco indicado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da doença de Chagas na maioria dos países endêmicos, inclusive no Brasil (COURA; BORGES-PEREIRA, 2010). O mecanismo de ação do Bz, apesar de não estar totalmente elucidado, pode estar relacionado ao fato desta molécula servir como uma pró-droga sendo seu grupo nitro (NO_2) reduzido a um grupo amino (NH_2) pelas enzimas nitroredutases, com isso, há formação de intermediários reativos (nitro radicalar (R-NO_2) e hidroxilamina (R-NHOH)). No caso do Nx, o radical nitro entra no ciclo redox com o oxigênio molecular. Além disso, o ânion superóxido (O_2^-) formado é metabolizado pela superóxido dismutase (SOD), produzindo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), seguido da formação de hidroxila (OH) livre. Tanto os intermediários reativos, quanto os radicais livres se ligam às macromoléculas, como lipídios, proteína e DNA, causando danos ao material genético do parasito. No parasito, tripanotiona (T(SH)_2) e glutationa (GSH) se conjugam a metabólitos eletrofilicos produzindo conjugados droga-tiol, sendo metabolizados posteriormente. A oxidação da T(SH)_2 e GSH conseguem ainda neutralizar radicais livres. Por possuir níveis reduzidos de enzimas antioxidantes, o *T.cruzi* tem a capacidade limitada de detoxificar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), produzidos

após contato com o Bz (Figura 9) (MAYA *et al.*, 2007; DATTANI *et al.*, 2021; LOSADA-GALVÁN *et al.*, 2021).

Figura 9 - Mecanismo de ação proposto do Benznidazol e Nifurtimox.



Fonte: Adaptado de MAYA *et al.*, 2007.

O Nx por ser considerado mais tóxico que o Bz, desde 1980, foi descontinuado em diversos países da América do Sul, apresentando diversos efeitos colaterais, tais como: anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, manifestações digestivas, sonolência ou excitação, náuseas, vômitos, diarreia, hipersensibilidade, dermatite, linfadenopatia. Ainda hoje o Bz é utilizado como primeira escolha para o tratamento da DC, apesar de também ter sido relatado sintomas de hipersensibilidade, dermatite, erupções cutâneas, edemas, dores articular e muscular, depressão da medula óssea, púrpura trombocitopênica, agranulocitose, polineuropatias (LOSADA-GALVÁN *et al.*, 2021).

A baixa solubilidade do Bz associado com um tratamento prolongado de altas doses, contribuem para o aparecimento dessas reações adversas (BERMUDEZ *et al.*, 2016). Tanto o Nx como o Bz possuem uma atividade significativa durante a fase aguda da DC, essa eficácia pode variar ainda com diferentes níveis de virulência e parasitismo, como também em uma fase mais tardia, como durante a fase crônica, onde esses medicamentos apresentam eficácia insatisfatória (KRATZ, 2019).

Assim há necessidade de se testar novas substâncias promissoras para o tratamento dessa doença, principalmente durante a fase crônica. Contudo, essa busca deve estar baseada no planejamento racional de novos fármacos, associado ao controle, prevenção e evolução da DC (SOEIRO; CASTRO, 2009). Além da possibilidade de existirem cepas de *T. cruzi*

resistentes aos medicamentos convencionais, ocorre ainda problemas relacionados à deficiência dos sistema de saúde, infraestrutura limitada, que favorecem o aumento dessa resistência e a ineficácia do tratamento (CLAYTON, 2010; LIMA *et al.*, 2023).

1.7 Desenvolvimento de novos fármacos contra *Trypanosoma cruzi*

Apesar dos esforços e estratégias para erradicar a DC, é importante a busca por um novo arsenal quimioterápico, para impedir sua progressão e diminuir os riscos de transmissão. A busca de novas moléculas é uma tarefa bastante árdua, pois necessita de comprovação de sua eficácia, potência e segurança para se tornar uma droga ideal (PAUCAR; MORENO-VIGURI; PÉREZ-SILANES, 2016; PÉREZ-MOLINA *et al.*, 2021).

Uma das possibilidades que contribuem para o desenho de novas moléculas, ocorre através da triagem virtual, como o docking molecular. Essa tecnologia contribui para a identificação de novas moléculas e possíveis ligações em proteínas-alvo. O objetivo é prever como ocorrem essas interações entre o complexo ligante-proteína (FEINSTEIN; BRYLINSKI, 2015; SULIMOV *et al.*, 2021).

O desenvolvimento de novos fármacos é baseado em diferentes estratégias, como o desenho de moléculas que atuam em algum alvo específico, como enzimas, proteínas ou DNA. No caso de parasitos, o alvo pode estar envolvido em funções vitais ou em sua infectividade. Com a compreensão da bioquímica do *T. cruzi* foi possível a descoberta de diversos alvos terapêuticos, principalmente a pesquisa de novas drogas que são capazes de inibir enzimas importantes para o metabolismo do parasito, com isso interferindo em sua sobrevivência (URBINA, 2010; FRANCISCO *et al.*, 2020; BELTRAN-HORTELANO *et al.*, 2022).

Diversos estudos já permitiram a identificação de diversas enzimas consideradas como alvos de novas drogas anti *T. cruzi*: tripanotiona redutase (BATTISTA *et al.*, 2020), as cisteíno-proteases (SIQUEIRA-NETO *et al.*, 2018), a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (DE MENEZES *et al.*, 2019), sirtuínas (MATUTINO-BASTOS *et al.*, 2020) e cruzainas (HERRERA-MAYORGA *et al.*, 2019).

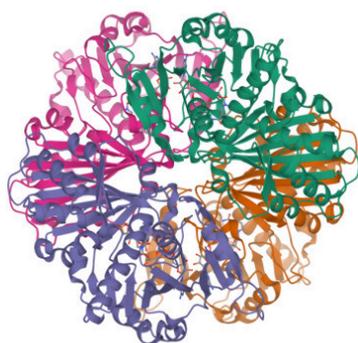
1.8 Enzimas alvos do *Trypanosoma cruzi*

1.8.1 Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH)

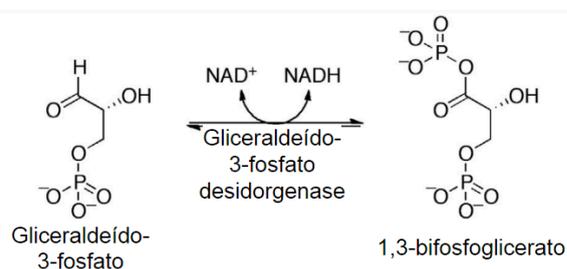
A GAPDH é uma enzima presente nos glicossomas do *T. cruzi*, importante na produção de energia, presente na via glicolítica a qual converte o D-gliceraldeído-3-fosfato em 1,3-bisfosfoglicerato, através da fosforilação oxidativa, na presença de NAD^+ e fosfato inorgânico. Ela é tetramérica, com subunidades idênticas (359 resíduos) e massa molecular de 156 kDa (RIVERA *et al.*, 2009). A inibição da GAPDH altera o metabolismo energético e a produção de ATP (Trifosfato de adenosina), importantes para o ciclo de vida do parasito (Figura 10) (PARIONA-LLANOS *et al.*, 2015).

Figura 10 - Estrutura 3D da GAPDH do *T. cruzi* (A). Reação catalisada pela GAPDH (B).

A



B



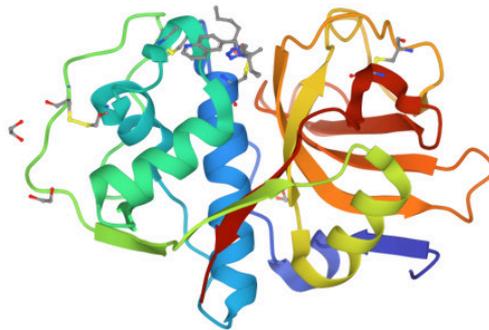
Fonte: (A) Imagem do RCSB PDB (rcsb.org) do PDB 1K3T (PAVÃO *et al.*, 2002). (B) Adaptado de PATRICK, 2020.

Diversos estudos já evidenciaram a GAPDH como sendo um alvo preferencial na busca de inibidores em produtos naturais. A chalepina é uma cumarina que se liga a um sítio específico da GAPDH, complexo esse mostrado através de técnicas cristalográficas de raios-x. Assim é possível a busca de drogas anti-chagásicas que possam inibir a GAPDH tendo por base a chalepina, sendo possível a otimização e aperfeiçoamento dessa nova molécula (Figura 10) (RIVERA *et al.*, 2009). Além disso, essa enzima apresenta similaridade estrutural quando comparada a enzima GAPDH humana de aproximadamente 45 % (identidade sequencial) e, por isso, podem ser investigadas para a inibição seletiva dos parasitos (FREITAS *et al.*, 2009).

1.8.2 Cruzaína

A cruzaína é uma protease composta por cisteína, expressa como cruzipaina ou GP57/51, presente em todas as fases do ciclo do *T. cruzi*. Seu sítio ativo é formado por 215 resíduos de aminoácidos, possui interações hidrofóbicas com Trp 177 (triptofano). Essa protease é essencial para o ciclo de vida do parasito e sua patogenia, sendo relacionado a diversos mecanismos de adaptação. Essa enzima permite que através de um determinado mecanismo, o parasito consegue escapar do sistema imune do hospedeiro. Além disso, está relacionada na invasão e destruição de tecidos, capacidade do parasito migrar para locais específicos para o crescimento e desenvolvimento, além de adquirir nutrientes essenciais que garantem a sobrevivência e proliferação para manutenção da infecção (Figura 11) (FERREIRA; ANDRICOPULO, 2017; BARBOSA DA SILVA *et al.*, 2019).

Figura 11 - Estrutura 3D da cruzaína do *T. cruzi*.



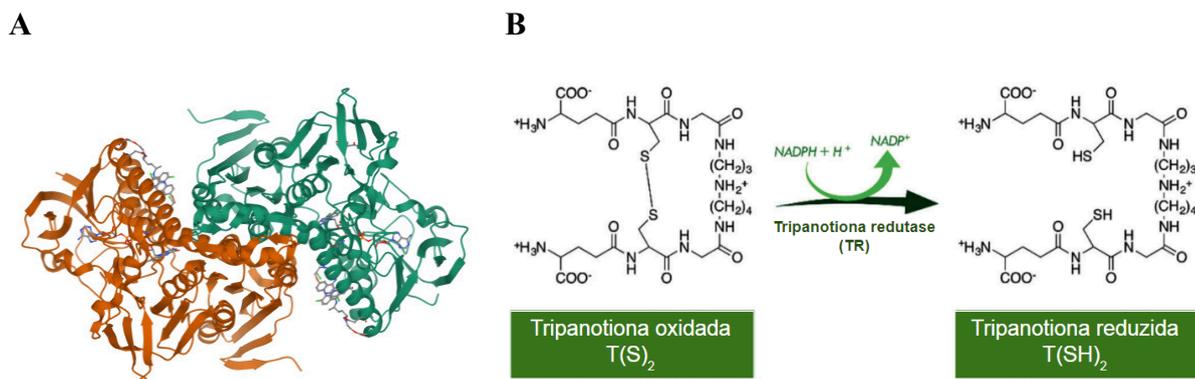
Fonte: Imagem do RCSB PDB (rcsb.org) do PDB 3IUT (BRAK *et al.*, 2010).

1.8.3 Tripanotiona redutase (TR)

A tripanotiona redutase é uma enzima composta por 484 resíduos de aminoácidos. Sua ação consiste na oxi-redução da tripanotiona. A TR é essencial para os tripanossomatídeos evitar danos mediados por espécies reativas de oxigênio (EROs). A atividade antichagásica está relacionada a inibição dessa enzima juntamente com a liberação de radicais superóxido no interior do parasito (RIVERA *et al.*, 2009). A TR é considerada um ótimo alvo para a busca de novas drogas anti *T. cruzi*. Para o desenvolvimento de novas drogas que possam inibir a TR é necessário levar em consideração o planejamento desse fármaco tendo por base a estrutura do substrato, deve ser capaz de formar radicais livres e

impedir a formação de dímeros da TR, uma vez que sua forma ativa é dimérica (Figura 12) (VÁSQUEZ *et al.*, 2017; MENDONÇA *et al.*, 2018).

Figura 12 - Estrutura 3D da TR do *T. cruzi* (A). Reação catalisada pela TR (B).



Fonte: (A) Imagem do RCSB PDB (rcsb.org) do PDB 1GXF (SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004). (B) Adaptado de BELTRAN-HORTELANO; PEREZ-SILANES S; GALIANO, 2017).

A TR possui semelhança estrutural com a enzima glutationa redutase (GR) em humanos, 41% da sequência de aminoácidos homólogos, esse é um fator importante a se considerar no momento da busca ou desenho de novas moléculas capazes de inibi-la. Com isso, a molécula inibidora deve ser capaz de inibir seletivamente apenas a enzima do parasito sem interferir na GR dos mamíferos. Além disso, essas enzimas apresentam alta afinidade, seletividade e eficiência catalítica, pelos seus respectivos substratos (BELTRAN-HORTELANO; PEREZ-SILANES S; GALIANO, 2017).

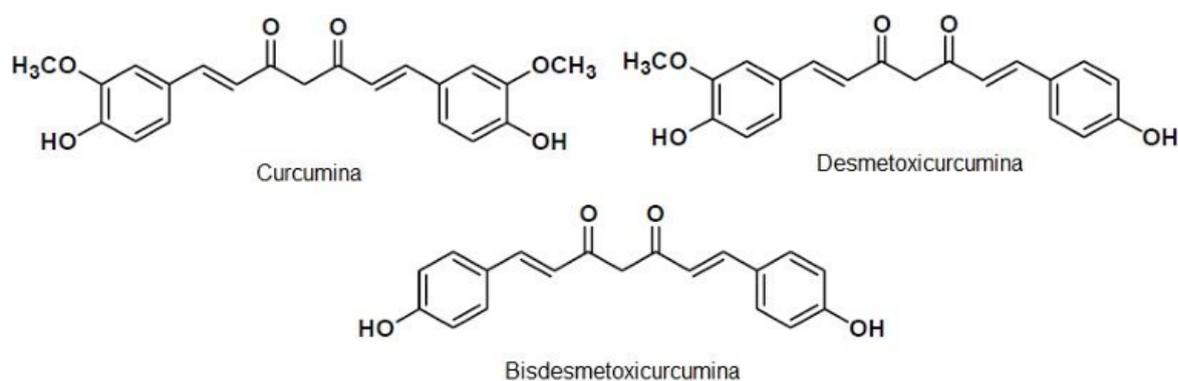
1.9 Curcuminóides

A *Curcuma longa*, popularmente conhecida como “açafão-da-índia”, “açafão-da-terra”, “cúrcuma” ou “turmeric”, é um arbusto endêmico da Índia, Sul da Ásia e Indonésia. É bastante utilizada em diversos países, principalmente devido às suas propriedades medicinais e também pelo seu uso na culinária (SOLEIMAN; SAHEBKAR; HOSSEINZADEH, 2018; HEWLINGS; KALMAN, 2017).

A síntese da curcumina foi desenvolvida primeiramente em 1918, sendo mais tarde desenvolvido outro método mais simples descrito por Pabon (1964), usando vanilina, acetilacetona, trióxido de boro e (B_2O_3), borato de triálquilo e n-butilamina. A curcumina pode ser extraída e purificada a partir da cúrcuma por diversos métodos, um deles seria a extração utilizando solventes orgânicos, juntamente com métodos cromatográficos. Outros métodos bastante utilizados são a extração por Soxhlet, ultrasônica e por microondas (PRIYADARSINI, 2014), extração em lote e por processo de partição trifásica (PATIL; BHASARKAR; RATHOD, 2019).

A partir das moléculas da cúrcuma é possível obter diversas moléculas análogas denominadas curcuminóides, produzidas de forma natural ou sintética (ANAND *et al.*, 2007). Os análogos naturais identificados da cúrcuma, incluem: curcumina (CUR), demetoxicurcumina (DMC) e bisdemetoxicurcumina (BMC) (FAROOQUI, 2019) (Figura 13). A curcumina disponível comercialmente é composta pela mistura desses três curcuminóides, sendo a proporção de 75-80% (m/m) de CUR, 15-20% (m/m) de DMC e 3-5% (m/m) de BMC (AHMED; GILANI, 2014).

Figura 13 - Estrutura química da curcumina e derivados curcuminóides naturais.



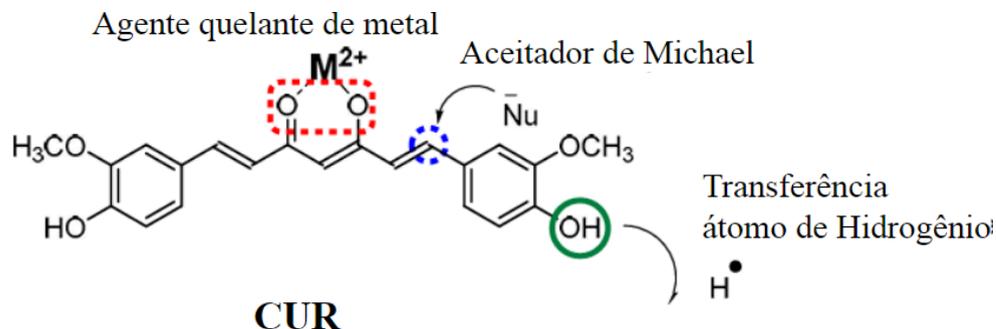
Fonte: PRIYADARSINI, 2014.

A molécula da curcumina se apresenta como diferuloilmetano, ou 1,6-heptadieno-3,5-diona-1,7-bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-(*1E*, *6E*) (PRASAD *et al.*, 2014), sendo três principais estruturas que compõem sua molécula: dois sistemas de anéis aromáticos contendo grupos o-metoxifenólicos, conectados por um ligante de sete carbonos que consiste em uma porção β -dicetona α,β -insaturada (PRIYADARSINI, 2014). Essa porção faz com que

a molécula da curcumina apresente um tautomerismo ceto-enólico, com isso possuindo uma funcionalidade adicional para arranjo de grupos doadores e receptores de ligação de hidrogênio (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; STANIĆ, 2017). A forma ceto da molécula da curcumina e sua alta capacidade de metilação e baixo nível de hidrogenação, estão associados a sua propriedade antioxidante (KOCAADAM; ŞANLIER, 2017; SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

Os principais sítios reativos da CUR incluem: uma porção β -dicetona α , β -insaturada que é considerada um ótimo agente quelante de metais, formando complexos com diversos íons metálicos; uma outra porção funciona como aceitador de Michael, em reação de adição nucleofílica que ocorrem entre um nucleófilo (como -OH, SH- e -SeH) e a porção cetona α , β -insaturada da CUR. Outro sítio reativo, envolve um doador de átomo de hidrogênio da hidroxila presente no anel aromático (KOTHA; LUTHRIA, 2019) (Figura 14).

Figura 14 - Locais de reatividade química na curcumina que contribuem para sua atividade



Fonte: Adaptado de KOTHA; LUTHRIA, 2019.

Diversas propriedades medicinais da curcumina já foram descritas: anticancerígena (JI; HUANG; ZHU, 2012), anti-inflamatória, antioxidante, imunomodulador (MEMARZIA *et al.*, 2021), antidepressiva (FUSAR-POLI *et al.*, 2020), antibacteriana, antiviral, antifúngica (ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2014; KHAN *et al.*, 2021), antiparasitária (HADDAD; SAUVAIN; DEHARO, 2010; RAI *et al.*, 2020).

A curcumina possui uma margem segura para uso em humanos, sendo a dose recomendada entre 4 e 8 g (BASNET; ŠKALKO-BASNET, 2011). Apesar de possuir uma boa lipofilicidade, sua biodisponibilidade é baixa, sendo facilmente degradada em condições

fisiológicas. Por exemplo, a 37 ° C e pH neutro (7,2), a curcumina $t_{1/2}$ foi relatada em menos de 10 minutos (NELSON *et al.*, 2017). O metabolismo da CUR ocorre principalmente por redução e conjugação (KOTHA; LUTHRIA, 2019). Essas características podem limitar seu grande potencial terapêutico (ANAND *et al.*, 2007).

Com o aprimoramento das diversas técnicas e métodos, associados com as diversas propriedades da curcumina, vários trabalhos já descreveram a síntese de derivados curcuminóides, planejados a partir de modificações moleculares, com substituições ou adição de grupos orgânicos ou na cadeia central desses análogos da curcumina, para gerar compostos com maior atividade biológica (GAGANDEEP *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2021; CHENG *et al.*, 2022). Assim novas moléculas sintéticas, derivadas da curcumina, poderiam tornar-se ótimas candidatas com efeito tripanocida.

2 Justificativa

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada sendo um grande problema mundial por causar um grande impacto na saúde pública, principalmente em países da América Latina. Aproximadamente 7 milhões de pessoas são acometidas pela Doença de Chagas, principalmente em países de terceiro mundo. Esse número ainda pode ser subestimado pela falta de casos não notificados. Só na América Latina, ocorrem cerca de 7.000 óbitos por ano (PAHO, 2022). No Brasil esses números ainda são considerados alarmantes, com quase um milhão de casos (OMS, 2023; BRASIL, 2021).

O agente causador da DC, *Trypanosoma cruzi*, sendo transmitido pelo inseto barbeiro, conta com apenas uma opção de tratamento no Brasil: benznidazol. Sendo eficaz apenas na fase aguda da doença com taxa de cura de mais ou menos 80%. Além disso, possui severos efeitos colaterais, sendo impreterível mais pesquisas de novas substâncias para a terapia da DC (STERVEDING, 2014; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). A fase crônica é caracterizada pelo aparecimento de sintomas mais graves após muitos anos da contaminação, com alterações no sistema digestório e cardíaco (ECHAVARRÍA *et al.*, 2019; DANTAS, 2021).

Assim, é de importante relevância a pesquisa de drogas/substâncias contra atividade tripanocida que seja segura para uso em humanos, com baixa toxicidade e menos efeitos adversos. As estratégias de novos candidatos a fármacos anti *T. cruzi*, incluem a triagem virtual, identificando possíveis alvos, como enzimas específicas que sejam vitais para o parasito. Outro ponto chave consiste na modificação molecular de substâncias naturais. (SULIMOV *et al.*, 2021).

Estudos mostram que a molécula da curcumina apresenta diversas finalidades, além de efeito antiparasitário. Assim como moléculas derivadas da curcumina, curcuminóides, já demonstraram efeito tripanocida. Diante disso, a otimização da curcumina tem como objetivo o surgimento de uma nova molécula com capacidade de apresentar um potente efeito tripanocida. Esse efeito poderá ser atribuído a alterações / modificações em estruturas vitais do *T. cruzi*. Além disso, diversos estudos já mostraram que a curcumina possui diversos grupos em sua molécula com alto valor biológico (SOUZA *et al.*, 2021; FRANCISCO *et al.*, 2023).

Assim, este presente trabalho, tem como fundamento a testagem *in vitro* de um derivado curcuminóide (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn) contra

cepa Y das formas de vida do *T. cruzi*, com a justificativa de ser uma nova alternativa quimioterápica promissora para o tratamento de pacientes acometidos pela DC, principalmente para a fase crônica. Além de explorar melhor a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito do DBAn contra o *T. cruzi*.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial tripanocida *in vitro* do (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAnisalaldeído) DBAn em cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a citotoxicidade do DBAn em células hospedeiras.
- Determinar o efeito antiparasitário do DBAn sobre formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.
- Determinar o nível de stress oxidativo citoplasmático e mitocondrial do DBAn em *T. cruzi*.
- Avaliar alterações no potencial transmembrânico mitocondrial induzida pelo DBAn em *T. cruzi*.
- Investigar os mecanismos de morte celular do DBAn em *T. cruzi*.
- Investigar a interação teórica do DBAn com enzimas-alvo de *T. cruzi* por docking molecular.
- Realizar a predição *in silico* dos parâmetros farmacocinéticos do DBAn.
- Analisar os sinergismo do DBAn e Benznidazol em células hospedeiras.
- Analisar os sinergismo do DBAn e Benznidazol sobre as formas de vida do *T. cruzi*.

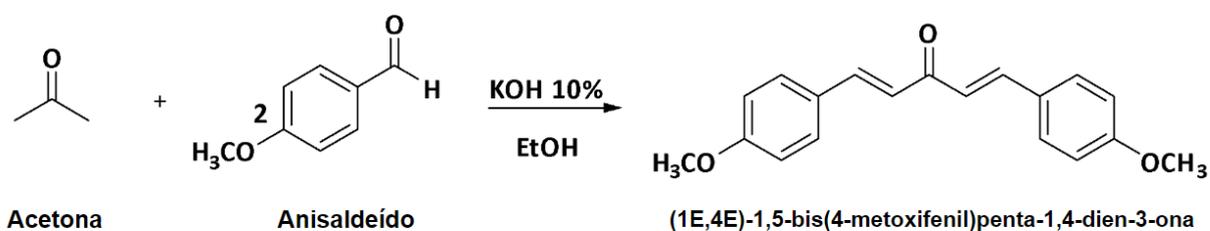
MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Síntese e caracterização química do derivado curcuminóide

A molécula (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAnisaldeído) (DBAn) ($C_{19}H_{18}O_3$, PM = 294,35 g/mol) foi cedida pelo Laboratório de Síntese Orgânica, da Universidade Estadual do Vale do Acaraú (UVA), coordenado pelo Prof. Dr. Hécio Silva dos Santos. A síntese da DBAn foi realizada pelo método de condensação de Claisen-Schmidt, acetona com anisaldeído (OLIVEIRA *et al.*, 2020). Em um Erlenmeyer contendo 50 mL de KOH 10% (m/v) e 40 mL de etanol, 7 mL de anisaldeído:acetona (5:2) foi adicionado lentamente, sob agitação, e a temperatura foi mantida em 0°C. Após 30 min, a mistura foi filtrada: o precipitado obtido foi lavado com pequenas porções de água destilada. O composto foi redissolvido em etanol quente, filtrado e deixado resfriar em banho de gelo. Os cristais formados foram lavados com etanol frio e secos à temperatura ambiente. A figura 15 mostra a reação de síntese da DBAn.

Figura 15. Reação para a síntese do DBAn.



Fonte: Adaptado de Oliveira e colaboradores (2020)

A caracterização do DBAn foi realizada por espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN), equipamento Avance DPX-500 (BRUKER, Billerica, Massachusetts, EUA); espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR), equipamento VERTEX 70V (BRUKER, Billerica, Massachusetts, EUA); cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM), equipamento GC-7890B/MSD-5977A (AGILENT TECHNOLOGIES, Santa Clara, Califórnia, EUA).

Os espectros de RMN de ^1H (500 MHz) e ^{13}C (125 MHz) foram obtidos utilizando o clorofórmio deuterado como referência (CDCl_3), e as mudanças químicas reportadas como valores de δ em partes por milhão (ppm) relativos ao CDCl_3 . A presença de grupos químicos no DBAn foi avaliada pela FT-IR, usando o modo de reflexão total atenuada (ATR). Os espectros foram obtidos a temperatura ambiente na faixa de número onda de 400 a 4000 cm^{-1} , acumulando 60 varreduras por espectro, com uma resolução de 2 cm^{-1} . Os espectros de massas para as substâncias foram obtidos pela análise de CG-EM, com analisador de quadrupolo a 70 eV e coluna capilar RTX5-MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm), com fluxo de injeção de $1,00\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, utilizando o gás hélio como gás de arraste. A temperatura do injetor foi mantida a $230\text{ }^\circ\text{C}$ e no forno, foi utilizado um gradiente de temperatura: inicial de $40\text{ }^\circ\text{C}$, tendo um aumento a uma taxa de $3\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ até atingir $280\text{ }^\circ\text{C}$, permanecendo até o fim da corrida analítica. As temperaturas da fonte de íons e interface de transmissão foram mantidas a $230\text{ }^\circ\text{C}$ e $280\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente.

Como fármaco de referência, foi usado o Benznidazol (Bz) ($\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_4\text{O}_3$, PM = 260,249 g/mol) como controle positivo, cedido pelo Laboratório Farmacêutico de Pernambuco (LAFEPE). Todas as substâncias foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) para obter soluções de estoque em uma concentração de 0,2 M. Para os ensaios, diluições em série foram feitas em solução de tampão fosfato estéril (PBS, constituído de NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH_2PO_4 1,47 mM e Na_2HPO_4 8,1 mM, pH 7,4) para obter soluções de trabalho, de modo que a concentração de DMSO não excedesse 0,5%.

O (3-(4,5-dimetilbrometo de iltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT); anexina V-PE, 7-AAD (7-aminocinomicina D), DCFH-DA (2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína) e rodamina 123 (Rho123) foram adquiridos da BD Biociências (NJ, EUA).

4.2 Docking molecular

Os ensaios de docking molecular para avaliação teórica das interações entre a molécula DBAn do presente estudo e as enzimas TcGAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), Cruzaina (TcCr) e Tripanotona Redutase (TcTR) de *Trypanosoma cruzi* foram realizados pelo Grupo de Química Teórica e Eletroquímica (GQTE), da Universidade Estadual do Ceará (UECE), coordenado pelo professor Dr. Emmanuel Silva Marinho.

A estrutura 2D do DBAn, do benznidazol, e dos inibidores co-cristalizados foram desenhadas utilizando o software MarvinSketch® (<https://chemaxon.com/products/marvin>) (CSIZMADIA, 2019). As estruturas tridimensionais foram otimizadas utilizando o software

Gaussian 09 através do método de Teoria do Funcional da Densidade (Density Functional Theory, DFT) (MARINHO *et al.*, 2021).

Estudos *in silico* foram utilizados para avaliar a interação teórica da molécula DBAn com enzimas alvos do *T. cruzi*: TcGAPDH, TcTR e TcCr. Para isso, as estruturas tridimensionais dessas proteínas foram obtidas do RBSC Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>). A enzima TcGAPDH está descrita como “estrutura do gliceraldeído-3-fosfato glicosômico desidrogenase do *T. cruzi* complexado com Chalepina (BRZ), um inibidor derivado da cumarina” (PDB 1K3T) (PAVÃO *et al.*, 2002). Para a TcTR, sua estrutura está apresentada como “estrutura cristalina da tripanotona redutase do *Trypanosoma cruzi* em complexo com o inibidor Quinacrina Mostarda” (PDB 1GXF) (SARAVANAMUTHU *et al.*, 2004) e a TcCr está identificada como “estrutura cristalina da cruzaina em Complexo com um Inibidor de Tetrafluorofenoximetil Cetona (KB2)” (PDB 3IUT) (BRAK *et al.*, 2010).

Para o preparo das enzimas alvos, foi utilizado os softwares AutoDock Tools® (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>) e UCSF Chimera® (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>), para remoção dos ligantes e interferentes complexados com as enzimas, a fim de se obter a estrutura cristalográfica de cada enzima isoladamente.

A busca de todos os possíveis modos de ligação entre proteína-alvo e ligante (DBAn) foi realizada pelo método de docking molecular, utilizando o programa Autodocking Vina (Molecular Graphics Lab). O algoritmo genético lamarckiano, presente no programa AutoDock Vina (TROTT; OLSON, 2010), foi utilizado para as simulações de docking molecular. Na área de simulação da ligação enzima-DBAn, aplicou-se o grid box para indicar coordenadas e parâmetros de tamanho, abrangendo todas as cadeias de proteínas. Ainda, foram realizadas cinquenta simulações independentes, obtendo 20 poses cada, para as simulações de docking e re-docking (MARINHO *et al.*, 2020).

As coordenadas para a TcTR foi centrado nas coordenadas 44.196; 3.102; -0.054 para os eixos x, y e z respectivamente com parâmetros de tamanho: 126Å (x) 90Å (y) e 126Å (z). Para a enzima TcGAPDH, a grade foi centrado nas coordenadas 19.822, 0.455 e 24.804 para os eixos x, y e z, respectivamente, com parâmetros de tamanho 116Å (x), 112Å (y) e 122Å (z). Para TcCr, a caixa de grade foi centralizada nas coordenadas 6.612, 0.436 e 8.052 para os eixos x, y e z, respectivamente, e com parâmetros de tamanho 116 Å (x), 106 Å (y) e 126Å (z) (Tabela 1). As grades foram centralizadas de forma com que as cadeias proteicas ficassem dentro deste espaço de simulação computacional. A cadeia proteica foi preparada

com base na metodologia proposta por Yan *et al* (2014), sendo retiradas moléculas de água e adicionados cargas de Gasteiger e átomos de hidrogênio essenciais. Para essa preparação foi utilizado o código ADT-AutoDocktools (MORRIS *et al.*, 2009).

Tabela 1. Parâmetros da caixa de grade para encaixe para as enzimas TcTR, TcGAPDH e TcCr.

Proteína	Grade			Tamanho da grade		
	x	y	z	x	y	z
TcTR	44.196	3.102	-0.054	126	90	126
TcGAPDH	19.822	0.455	24.804	116	112	122
TcCr	6.612	0.436	8.052	116	106	126

Fonte: Elaborado pelo autor

O refinamento parcial dos cálculos individuais dos acoplamentos foi ajustado para 64, com base no critério de Exhaustiveness. A estrutura da proteína permaneceu rígida, sendo ajustadas as ligações e torções dos ligantes (NGUYEN *et al.*, 2017). Tendo como critério de seleção da best pose, foi utilizada a medida dos valores RMSD (desvio quadrático médio), tendo como referência valores inferiores a 2 Å, fornecendo previsões de encaixes mais precisos (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021). A estabilidade da ligação das proteínas com a DBAn foi baseada na energia de afinidade (ΔG), sendo considerado ideal valores menores que -6,0 kcal/mol (SHITYAKOV; FORSTER, 2014). Obtendo-se os valores de ΔG , foram calculadas os valores da constante de inibição (K_i) (equação abaixo) de cada complexo (KADELA-TOMANEK *et al.*, 2021):

$$K_i = e^{\left(\frac{\Delta G}{RT}\right)}, \text{ onde:}$$

K= constante de inibição;

T = constante de temperatura absoluta, 298K;

R = constante do gás ideal, 8.32 J.mol⁻¹K⁻¹;

ΔG = energia livre de ligação em KJ.mol⁻¹.

Para avaliar a força das ligações de hidrogênio, foram utilizados os parâmetros propostos por Imberty (1991), que se baseia nos valores das distâncias entre os átomos doadores e receptores, onde as interações que ficaram entre 2,5 Å e 3,1 Å são classificadas como fortes, entre 3,1 Å e 3,55 Å são consideradas de intensidade média e fracas as que ficaram com distância superior a 3,55 Å.

Para uma validação das simulações foi realizada a técnica de re-docking. Ressaltando que todas as simulações foram com os mesmos parâmetros para obtenção de dados comparativos com o fármaco benznidazol (Bz) (ChemSpider ID 29299) e com os ligantes 6-(1,1-dimethylallyl)-2-(1-hydroxy-1-methylethyl)-2,3-dihydro-7h-furo[3,2-g]chromen-7-one (BRZ), Quinacrine mustard (QUM) e (3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimethyl-1-[(quinolin-6-ylmethyl)amino]propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-yl)heptan-2-one (KB2) que foram co-cristalizados nos cristais das proteínas TcGAPDH, Triantona Redutase e Cruzaina, respectivamente.

4.3 Parâmetros farmacocinéticos

O desenvolvimento de novas moléculas inclui o estudo das propriedades sua fase farmacocinética absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET), com isso a triagem e a otimização dessas propriedades nesta fase é de suma importância (WANG; SKOLNIK, 2009). O programa computacional SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) foi utilizado para descrever as propriedades físico-químicas da DBAn e Bz, os cálculos tiveram como base descritores moleculares utilizando a regra dos cinco de Lipinski (Lipinski *et al*, 2001). Essa regra permite identificar a predição de biodisponibilidade oral, assim uma molécula promissora deve possuir um peso molecular menor ou igual a 500 g/mol; número de grupos aceptores de ligação hidrogênio (nALH) menor ou igual a 10; número de grupos doadores de ligação hidrogênio (nDLH) menor ou igual a 5; coeficiente de partição octanol-água (miLog P) menor ou igual a 5; área de superfície polar topológica (TPSA) menor ou igual a 140 Å. Terá uma boa biodisponibilidade oral, moléculas que não possuam mais que uma violação dessas regras.

Os parâmetros farmacocinéticos (absorção, distribuição, metabolismo, excreção) e toxicológicos foram realizados através do servidor *pKCSM pharmacokinetics on line* (<http://biosig.unimelb.edu.au/pkcsm/prediction>).

4.4 Avaliação da citotoxicidade do DBAn em células hospedeiras

O teste de citotoxicidade do DBAn foi realizado na linhagem de células de mamíferos: LLC-MK2 (células epiteliais renais de macaco-*Macaca mulatta*), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em garrafas plásticas estéreis em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com soro bovino fetal (10%) e antibióticos (penicilina – 200 UI.mL⁻¹ e estreptomicina – 130 mg.mL⁻¹), incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. Ao atingir a confluência, as células foram lavadas com PBS estéril e deslocadas usando solução de tripsina-EDTA (0,25%/0,04%) e incubadas por 5 a 10 minutos a 37°C. A solução de tripsina foi inativada com meio DMEM com 10% de SBF. As células, então, foram centrifugadas por 5 minutos a 4000 rpm, e o pellet formado foi congelado para estoque ou utilizado para experimento. Para estocagem, as células foram congeladas em vials de criopreservação estéreis, usando SBF (95%) e DMSO estéril (5%). Para o repique, parte das células foram transferidas para uma nova garrafa de cultivo celular.

A viabilidade celular foi determinada utilizando o ensaio de redução do sal de brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólio (MTT) (MOSMANN, 1983). O ensaio do MTT verifica a capacidade oxirredutiva das células. Esse ensaio baseia-se na reação colorimétrica de conversão do MTT em sal de formazan. Para isso, o MTT internalizado nas células viáveis é reduzido no microambiente intracelular por desidrogenases citoplasmáticas e mitocondriais em um sal de formazan de cor azul violácea, insolúvel em meio aquoso. Esses cristais são solubilizados por um agente surfactante, dodecil sulfato de sódio (SDS) ou dimetilsulfóxido (DMSO) adicionado em seguida. A intensidade da cor violácea produzida é diretamente proporcional à quantidade de células viáveis (MENEZES, 2013).O resultado da reação é dado em leitura de absorvância realizada em espectrofotômetro, sob o comprimento de onda de 570 nm.

Para realização dos experimentos, as células LLC-MK2 foram removidas da garrafa, usando solução de tripsina/EDTA, centrifugadas (4000 rpm por 5 minutos), ressuspensas em 1 mL de meio DMEM, sendo uma alíquota diluída em solução de azul de trypan (0,4% m/v em PBS) nas proporções de 1:10 e 1:100, em seguida quantificadas em câmara de Neubauer. A densidade celular foi determinada conforme a fórmula abaixo:

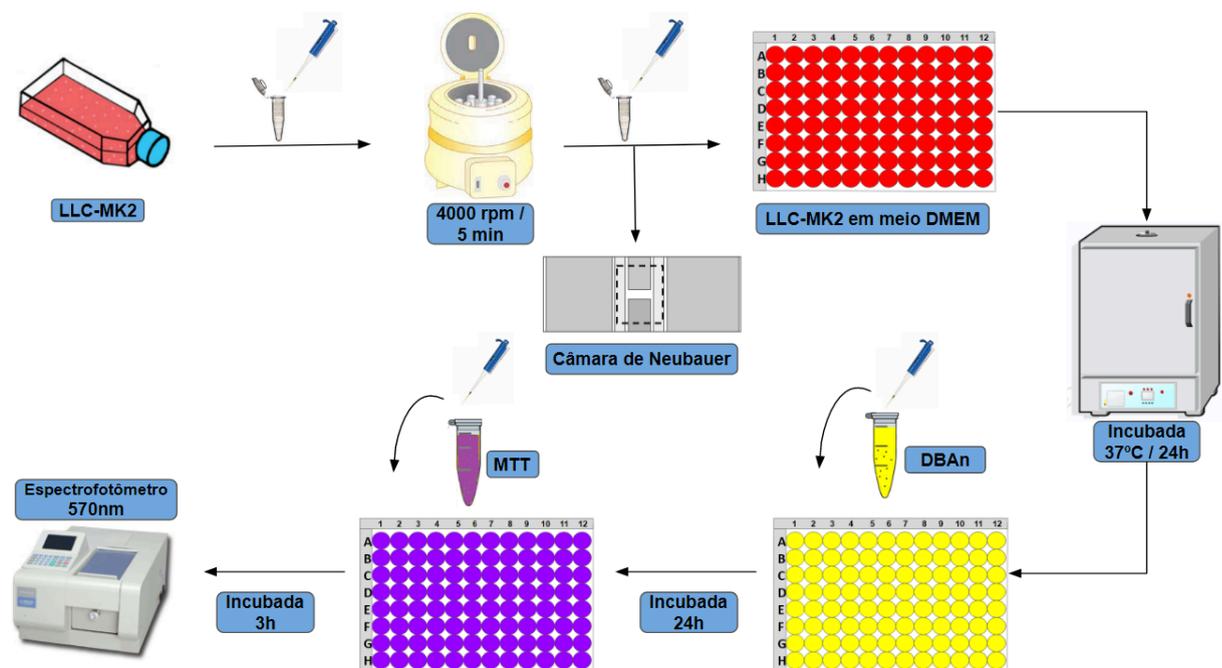
$$Densidade\ celular = \frac{Contagem}{10^4} \times Fator\ de\ diluição$$

Para a avaliação da citotoxicidade do DBAn, células LLC-MK2 foram transferidas para placas estéreis de 96 poços (10^5 céls/mL) em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) a 10% de SBF incubado a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas ou overnight, para permitir a adesão das células.

Após esse tempo, as células foram tratadas em placas de 96 poços com diferentes concentrações do DBAn (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 µM). O benznidazol (BZN) foi utilizado como fármaco de referência, nas mesmas concentrações. Como controle negativo, foram identificados poços contendo apenas células, sendo estes os grupos não tratados.. O grupo com células tratadas com o veículo DMSO 0,5% foi utilizado para testar a toxicidade deste diluente. As placas foram incubadas por 24 horas em estufa de CO₂.

Em seguida, as células foram centrifugadas por cinco minutos a 4000 rpm, lavadas com 100 µL de PBS, centrifugadas novamente e submetidas ao ensaio do MTT. Para isso, foram adicionados nos poços 100 µL de solução de MTT a 0,25 mg/mL. A placa foi incubada por mais 3 horas e, ao final deste tempo, foi centrifugada (4000 rpm/5 minutos) e foram colocados 100 µL de DMSO. Após 30 minutos de agitação, foi realizada a leitura em espectrofotômetro, a 570 nm. Foram feitos três experimentos em triplicata (Figura 16).

Figura 16- Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em células LLC-MK2.



Fonte: Elaborado pelo autor

A toxicidade sobre as células hospedeiras foi usada para definir as concentrações de trabalho dos ensaios *in vitro*, comparar com os resultados obtidos com BZN e estimar a CC_{50} (concentração capaz de causar toxicidade em 50% da população de células) por regressão não-linear. A CC_{50} foi utilizada para calcular o índice de seletividade.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{Abs_{\text{Grupo tratado}} - Abs_{\text{branco}}}{Abs_{\text{Controle}} - Abs_{\text{branco}}} \times 100$$

4.5 Ensaios de atividade antiparasitária e mecanismo de ação *in vitro*

4.5.1 Epimastigotas

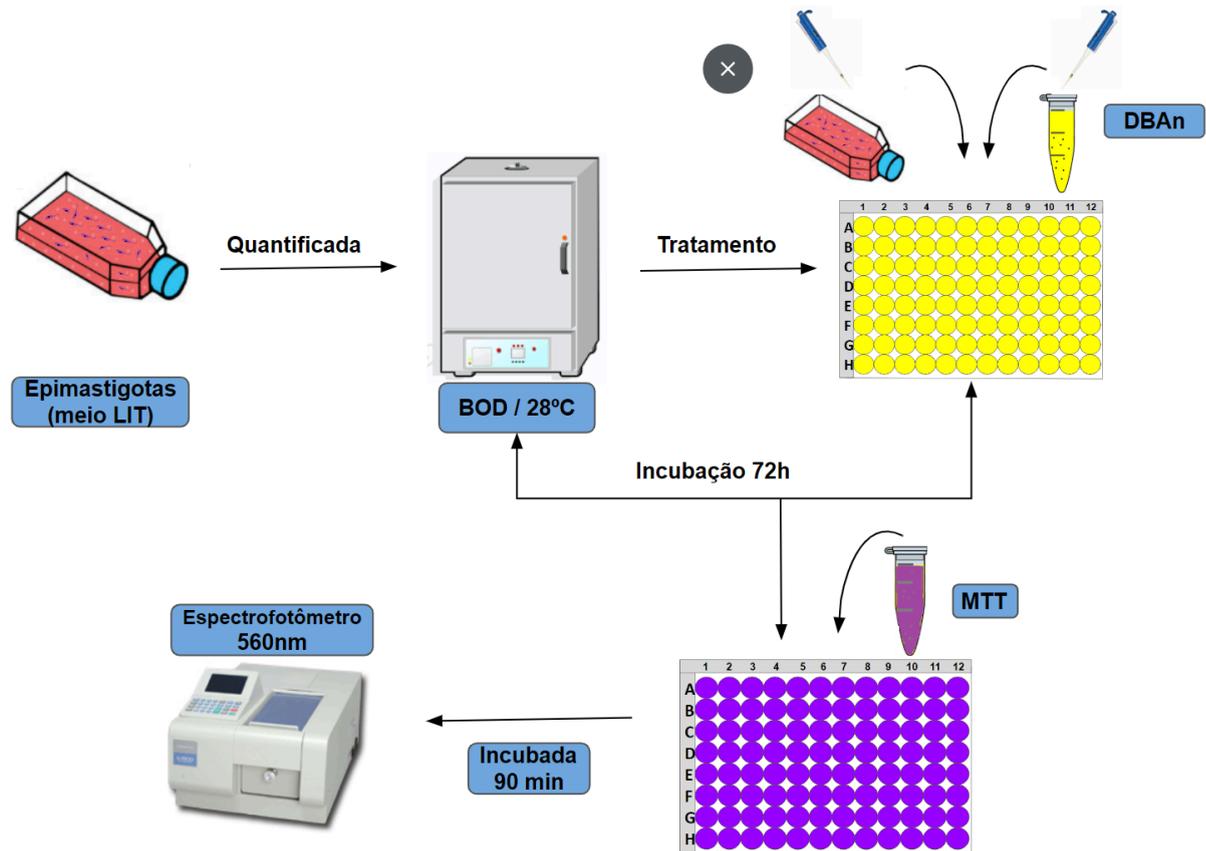
As formas epimastigotas foram cultivadas em meio o LIT (Liver Infusion Tryptose, com NaCl 4 g.L⁻¹ ; Na₂HPO₄.12H₂O 11,6 g.L⁻¹ ; KCl 0,4 g.L⁻¹ ; glicose 2,2 g.L⁻¹ ; triptose 5 g.L⁻¹ ; infusão de fígado 5 g.L⁻¹ ; hemina bovina 25 mg.L⁻¹ ; pH 7,4), suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF), penicilina (200 UI/mL⁻¹) e estreptomicina (50 mg/L⁻¹), em incubadora BOD (Biochemical Oxygen Demand) a 28 °C (CAMARGO, 1964). Para manutenção das linhagens, repiques foram realizados a cada 6-8 dias, por transferência de uma alíquota de 10⁶ parasitos/mL para um novo meio LIT.

Uma alíquota de formas epimastigotas (3x10⁶ parasitos/mL) foi feita a partir da cultura, no 6º dia de cultivo, e incubada em frasco estéril em estufa BOD por 24 horas. Após o tempo de incubação, foram transferidas para placa de 96 poços com diferentes concentrações do DBAn (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 µM). O Bz foi utilizado como fármaco de referência para comparação, nas mesmas concentrações do DBAn, e DMSO 0,5% como veículo. A placa foi incubada na B.O.D por um período de 72h. Após isso, foi centrifugada e o sobrenadante foi descartado. Em seguida, foram adicionados 50 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL). A placa foi incubada na B.O.D por 90 minutos e em seguida foi lida por espectrofotometria em comprimento de onda de 570nm (Figura 17). Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes.

O percentual de viabilidade celular foi calculado em relação à cultura controle. Por fim, a concentração capaz de inibir metade do crescimento celular (IC_{50}) foi estimada por regressão não-linear e o percentual de parasitos viáveis calculado através da seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{Abs_{\text{Grupo tratado}} - Abs_{\text{branco}}}{Abs_{\text{Controle}} - Abs_{\text{branco}}} \times 100$$

Figura 17 - Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em formas epimastigotas de *T. cruzi*.



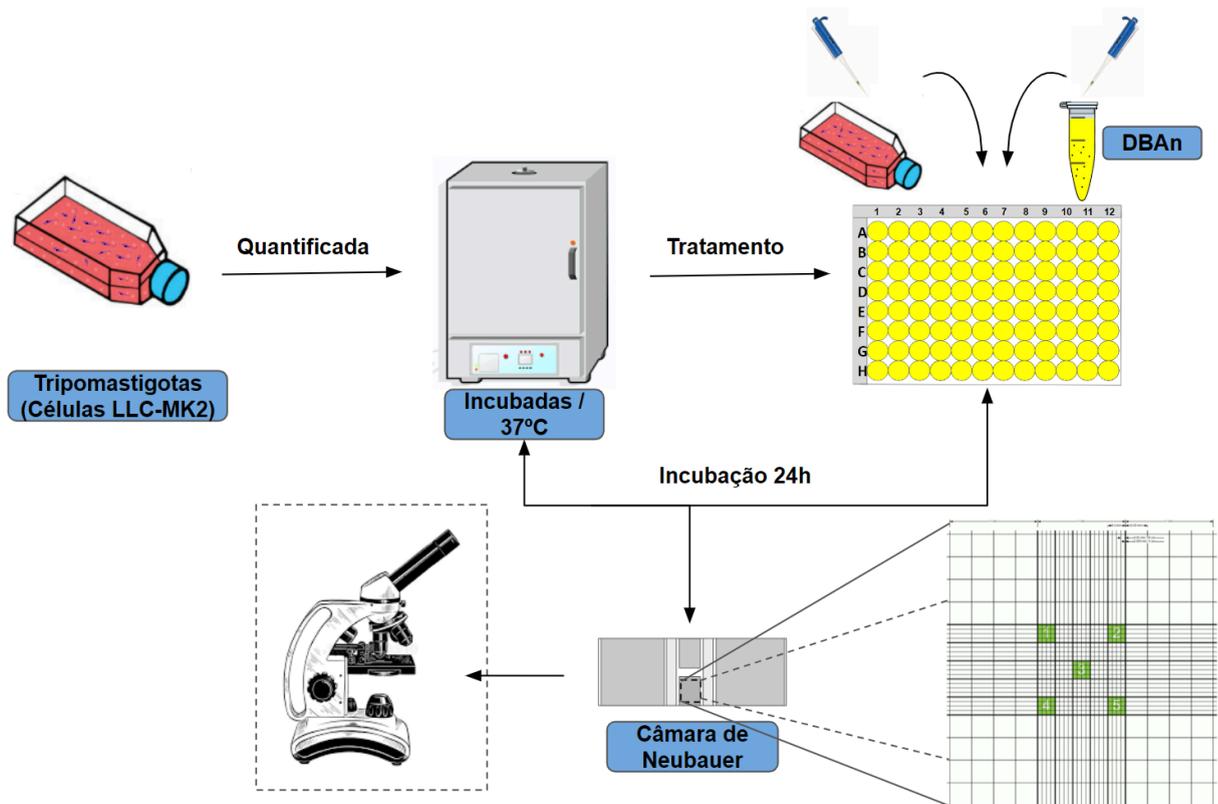
Fonte: Elaborado pelo autor

4.5.2. Tripomastigotas

As formas tripomastigotas foram obtidas a partir do sobrenadante de células epiteliais (LLC-MK2) infectadas, cultivadas em meio DMEM enriquecido com 2% de SBF e penicilina (200 UI/mL⁻¹) e estreptomicina (50 mg/L⁻¹), em atmosfera com 5% de CO₂ (ADADE; CHAGAS; SOUTO-PADRÓN, 2012). 10⁵ células/mL foram cultivadas em garrafas estéreis em DMEM com 10% de SBF. Após 48 horas de incubação, o meio foi substituído por DMEM 2% SBF e foram infectadas com 2x10⁶ parasitos/mL. Após conclusão do ciclo evolutivo, as formas tripomastigotas eclodiram das células e estes foram coletados para os experimentos ou congelados em SBF (95%) e DMSO estéril (5%).

Para a atividade tripanocida, 1×10^6 cél/mL de formas tripomastigotas/mL em placa de 96 poços em meio DMEM suplementados com 10% SBF e tratadas com diferentes concentrações do DBAn (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 μ M), grupo sem tratamento (controle negativo), Bz (controle positivo) nas mesmas concentrações do DBAn e DMSO 0,5% como veículo. A placa foi levada para a estufa, em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 °C por 24 horas. Para a quantificação dos parasitos, foi utilizada a câmara de Neubauer sendo feita a contagem nos cinco quadrantes centrais, utilizando o microscópio óptico. Os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (Figura 18).

Figura 18 - Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em formas tripomastigotas de *T. cruzi*



Fonte: Elaborado pelo autor

O índice de seletividade (IS) foi determinado através da CC_{50} (Concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade das células hospedeiras) das células LLC-MK2 sobre o resultado da LC_{50} (Concentração letal para 50% dos parasitos) das formas tripomastigotas, conforme fórmula a seguir:

$$IS = \frac{CC_{50} (LLC-MK2)}{LC_{50} (Tripomastigotas)}$$

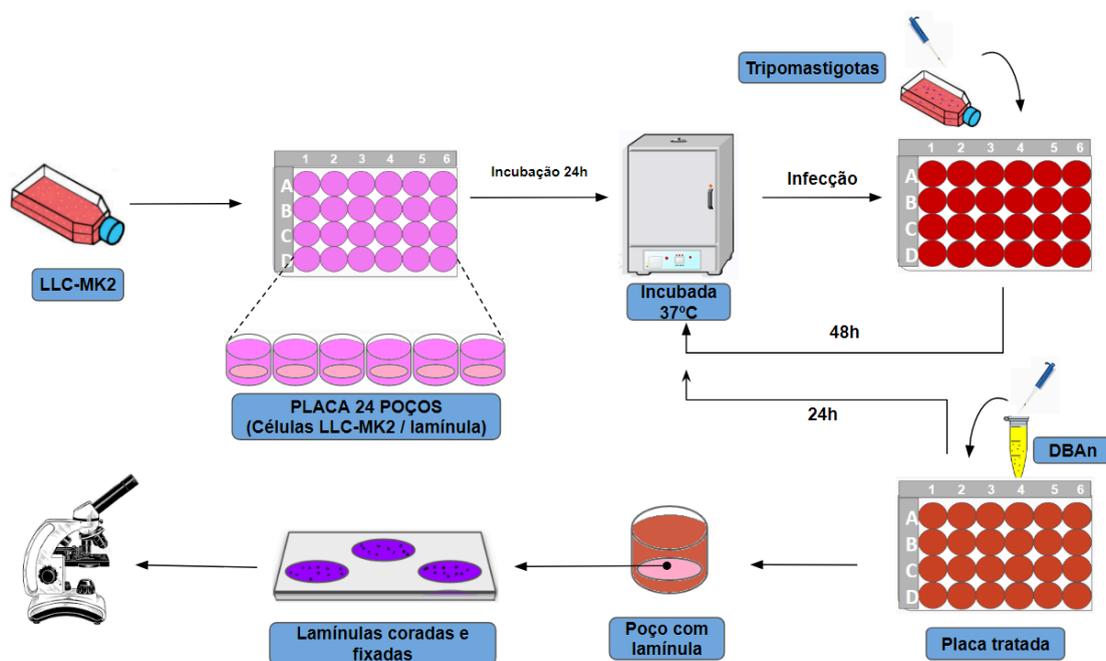
4.5.3. Amastigotas

Os ensaios da atividade anti-amastigota foram realizados de acordo com as concentrações efetivas encontradas nos ensaios com formas tripomastigotas, cujas quais não foram tóxicas para as células hospedeiras.

Para a cultura das formas amastigotas de *T. cruzi*, as células LLC-MK2 foram subcultivadas em meio DMEM a 10% de SBF na densidade de 10^5 células/mL em placas estéreis de 24 poços contendo lamínulas circulares de 13 mm. A placa foi incubada em atmosfera a 5% de CO_2 e 37°C por 24 h para que a cultura atingisse o estágio de semiconfluência. Após esse período, a cultura foi infectada com suspensão de tripomastigotas na densidade de 2×10^6 parasitos/mL e o meio de cultura foi substituído por meio DMEM a 2% de SBF e incubada por 48 h sob as mesmas condições.

As concentrações do DBAn (62,5; 31,25 e 15,6 μM) foram acrescentados nos poços e, após 24 horas de incubação, as lamínulas foram lavadas, fixadas em solução de Bouin e coradas com Giemsa para montagem em lâminas a serem observadas em microscópio. Como controle negativo as células foram tratadas com PBS e controle positivo foram tratadas com Bz (Figura 19) (ADADE *et al*, 2014).

Figura 19 - Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade do DBAn em formas amastigotas de *T. cruzi*.



Em cada lamínula, foi contado um total de 300 células, para determinação do percentual de células infectadas e o número de amastigotas por células infectadas, em três experimentos independentes (HERNÁNDEZ-CHINEA *et al.*, 2015; PEREIRA, 2015). Os resultados foram expressos como percentual de células infectadas e quantidade de amastigotas/100 células infectadas, de acordo com a seguinte fórmula:

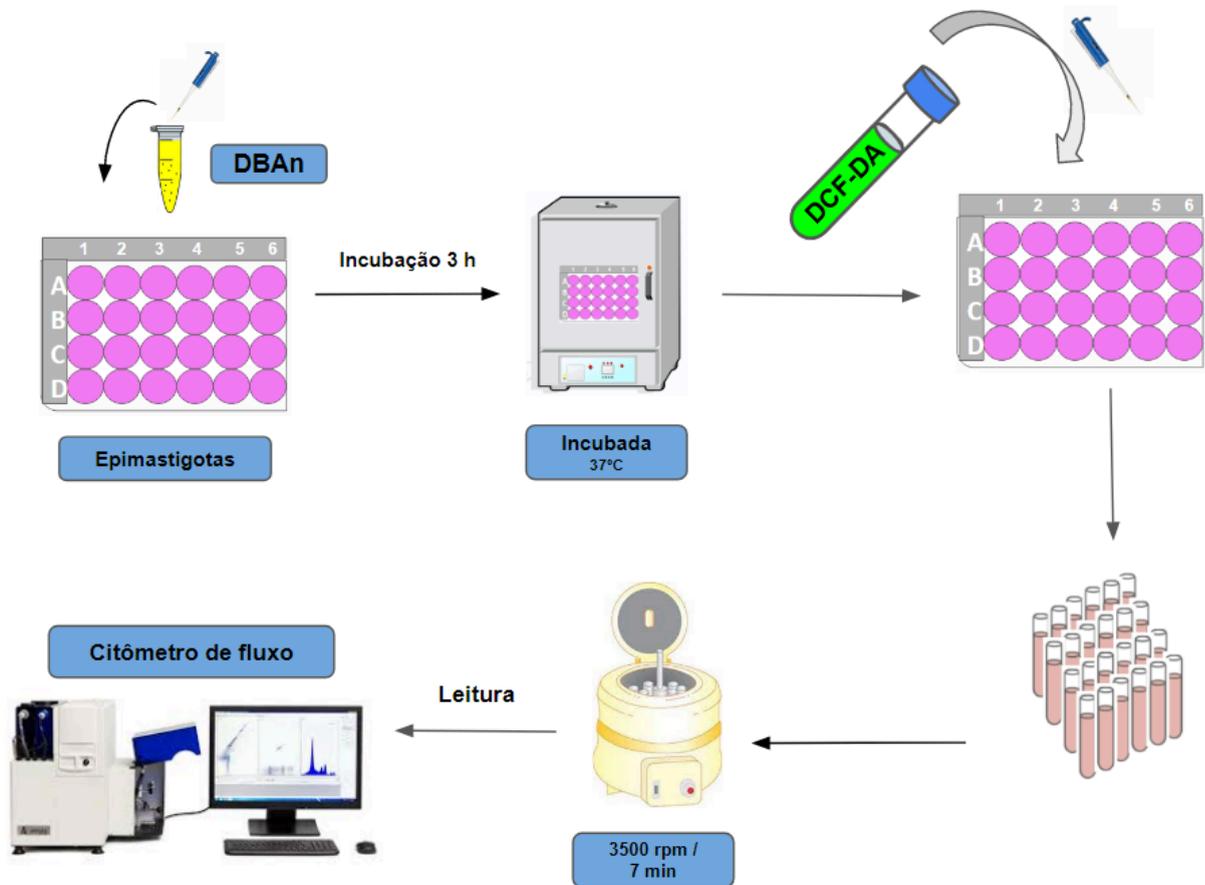
$$\%AA = \left[1 - \frac{\frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas}}{100 \text{ células}}(\text{grupo tratado})}{\frac{n^{\circ} \text{ de amastigotas}}{100 \text{ células}}(\text{grupo controle})} \right] \times 100$$

4.6 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O ensaio da produção de EROs, baseia-se na utilização de uma sonda, 2',7'-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH₂-DA), que possui a capacidade de atravessar a membrana plasmática das células. No interior da célula, essa sonda sofre ação de esterases, produzindo então 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH₂). Esse DCFH₂ é oxidado por ERO, convertendo-se em 2'7'- diclorofluoresceína oxidada (DCF). Essa molécula apresenta uma fluorescência FL1 (fluorescência verde, de 515-545 nm) (RAJNEESH *et al.*, 2017).

As formas epimastigotas (1 x 10⁶ parasitos/mL) de *T. cruzi* foram incubadas com DBAn (250 e 125 μM) em placa estéril de 24 poços. Após 3 horas de incubação, adicionou-se DCFH₂-DA (diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína) (20 μM). Após 24 h de incubação no escuro, as células foram coletadas, centrifugadas (3500 rpm por 7 minutos), lavadas 2x com PBS. A placa foi mantida no escuro até o fim do período de tratamento. Por fim, foram adicionados 400 μL do tampão de ligação em cada tubo e analisado em citômetro de fluxo (FACSCalibur, BD), utilizando, no mínimo 10⁴ células por aquisição, para análise da emissão de fluorescência (FL1). O aumento na fluorescência verde indica produção de EROs no citoplasma das células (ARANDA *et al.*, 2013). Como controle positivo, foi usado o terc-butilhidroperóxido (25 μM), um indutor do estresse oxidativo (Figura 20) .

Figura 20 - Ensaio de produção de espécies reativas de oxigênio por formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor

A intensidade de fluorescência emitida foi estimada pela média geométrica da intensidade de fluorescência nos diferentes grupos experimentais. A análise estatística foi feita a partir da intensidade relativa de fluorescência (IFR), determinada usando a fórmula abaixo, onde *m*TESTE corresponde a média geométrica do grupo tratado e *m*CONTROLE, a média geométrica do grupo controle.

$$IFR = \frac{mTESTE}{mCONTROLE}$$

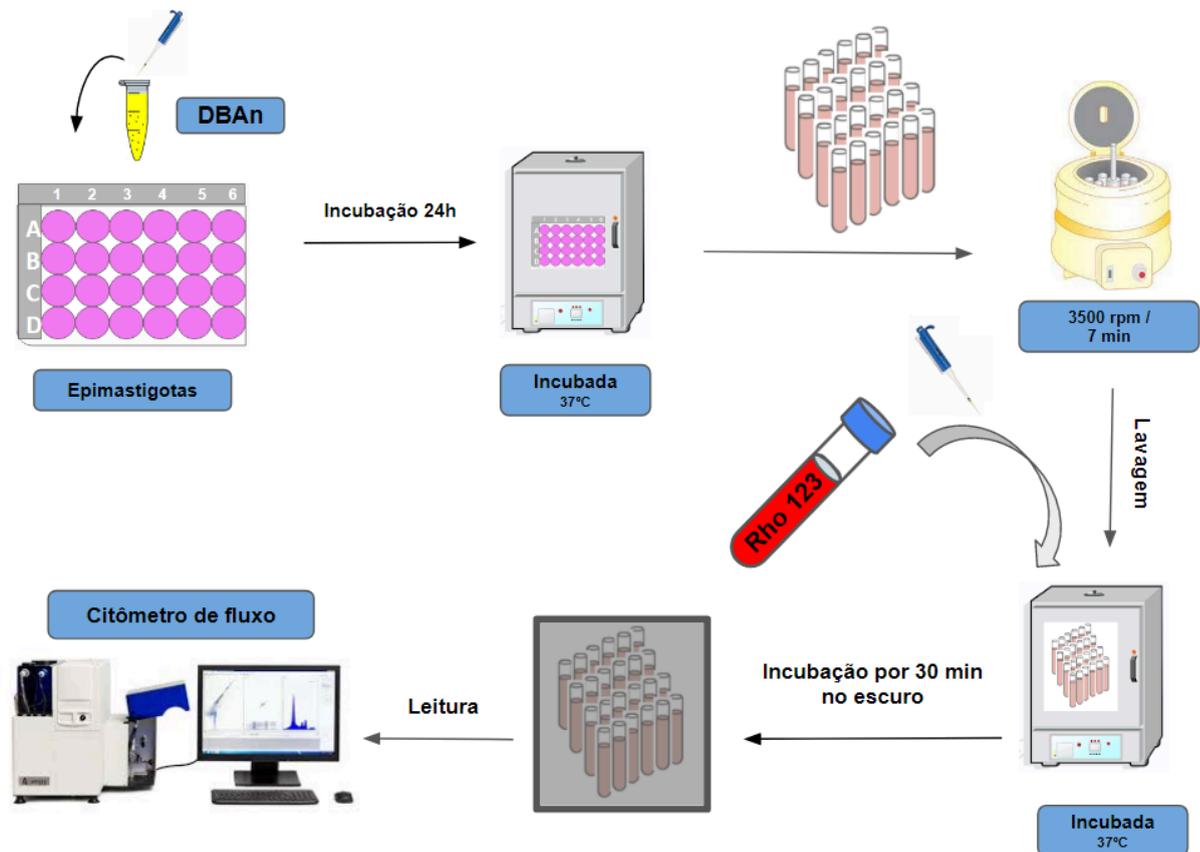
4.7 Avaliação da alteração do potencial transmembrânico mitocondrial

A avaliação do efeito das substâncias em estudo sobre a mitocôndria foi realizada utilizando a rodamina 123 (Rho123), um corante catiônico que se acumula em mitocôndrias intactas, emitindo fluorescência vermelha. Danos no potencial transmembrânico mitocondrial

($\Delta\Psi_m$) causa redução do acúmulo de Rho123. O fato de ser um fluorocromo catiônico (carregado positivamente) permite que seja atraído pelo elevado potencial elétrico negativo presente na membrana mitocondrial, incorporando-se no interior dessas organelas, emitindo uma fluorescência vermelha (FL2) (JOHNSON *et al.*, 1980).

Epimastigotas na concentração de 1×10^6 células/mL foram incubadas com DBAn (250 e 125 μM) e PBS (controle negativo) durante 24 horas em placas de 24 poços. Posteriormente as células foram centrifugadas a 3500 rpm por 7 minutos. O precipitado obtido foi lavado 2 vezes com PBS e ressuspensão em 500 μL de PBS. Em seguida as suspensões foram tratadas com Rho123 (10 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos no escuro, lavadas e analisadas por citometria de fluxo (FACSCalibur®, BD Pharmigen) utilizando, no mínimo 10^4 células por aquisição, o software Cell Quest (Becton-Dickinson, Califórnia, EUA) e também os parasitos foram analisados por microscopia de fluorescência (Figura 21) (KESSLER *et al.*, 2013). Os resultados foram expressos em termos de IFR.

Figura 21 - Ensaio de avaliação de potencial transmembrânico mitocondrial em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.



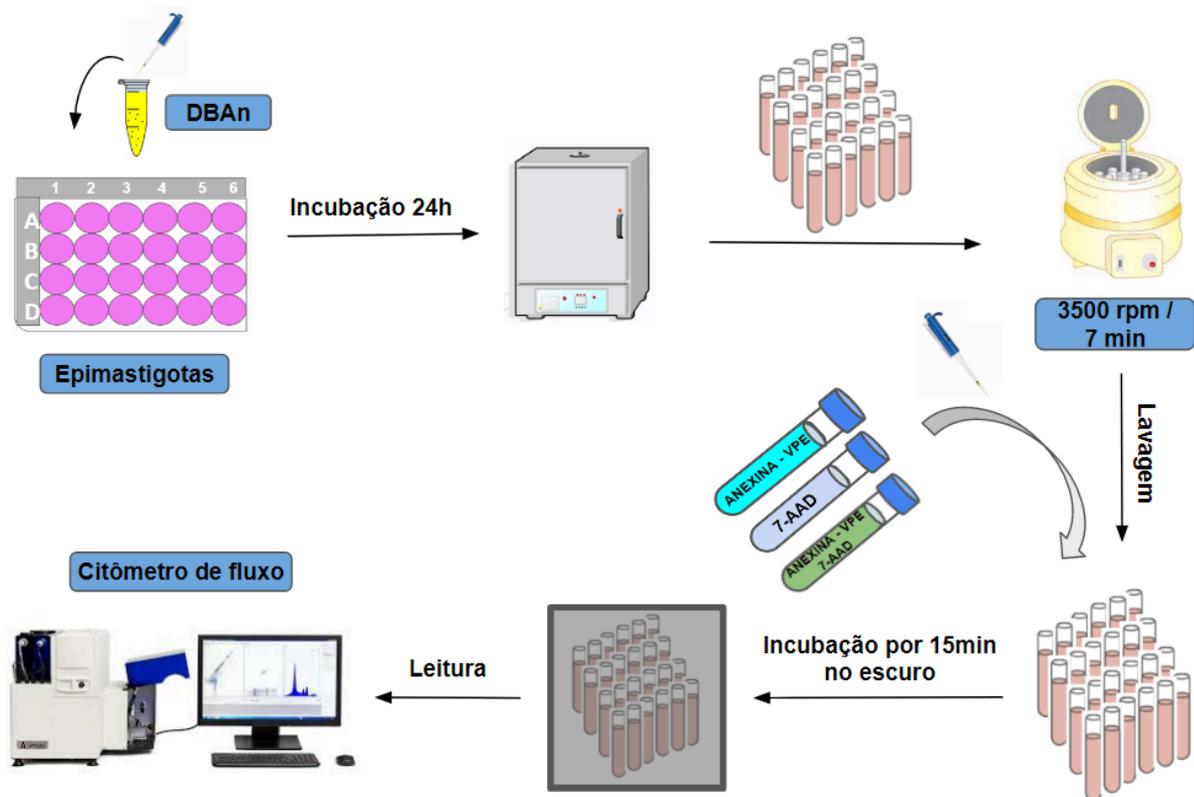
4.8 Quantificação de células necróticas e apoptóticas

Para identificação do potencial necrótico e/ou apoptótico das substâncias em estudo, as células tratadas foram submetidas à citometria de fluxo após marcação com anexina V-ficoeritrina (Ax/PE), marcador de apoptose por externalização da fosfatidilserina, uma proteína de membrana exposta durante o processo apoptótico. Esse processo está relacionado ao reconhecimento por fagócitos e consequente remoção de corpos apoptóticos do tecido (KIM *et al.*, 2020).

Outro fluorocromo utilizado foi o Amino actinomicina D (7-AAD), que liga-se a cadeias de DNA celular, mas é impermeável à membrana celular íntegra, assim é um sinalizador importante da perda de integridade da membrana caracterizando morte celular por necrose (WLODKOWIC *et al.*, 2011). Assim, células que apresentam alta marcação com 7-AAD perderam a sua integridade de membrana, característica importante da morte celular por necrose (CHAN; MCCULLEY; KESSEL, 2017).

As formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) de *T. cruzi* foram tratadas com DBAn (250 e 125 μ M) e PBS (controle) em placa de 24 poços incubada por 24 horas. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 3500 rpm por 7 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi lavado uma vez com PBS e outras duas vezes com tampão de ligação (0,01 M hepes/NaOH, pH 7,4, 0,14 M NaCl, 2,5 mM CaCl₂), sendo finalmente ressuspendido com 100 μ L do mesmo com 5 μ L 7-AAD e Anexina V- PE (10 μ g/mL). Após 15 minutos de incubação no escuro, foi adicionado 400 μ L de tampão de ligação em cada tubo para a análise no citômetro (FACSCalibur®, BD Pharmigen) utilizando, no mínimo 10^4 células por aquisição, o software Cell Quest (Becton-Dickinson, Califórnia, EUA) (Figura 22). Os eventos foram divididos em quatro quadrantes: células viáveis (para ambos os fluorocromos (7-AAD-/Ax-), células em necrose (7-AAD+/Ax-), apoptose (7-AAD-/Ax+) e células duplamente marcadas (7-AAD+/Ax+). O percentual de células marcadas com cada fluorocromo ou não marcadas foi obtido para análise estatística (KESSLER *et al.*, 2013).

Figura 22 - Representação esquemática do ensaio do potencial necrótico/apoptótico do DBAn sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor

4.9 Ensaios das atividades sinérgicas com DBAn + Bz *in vitro*

Os ensaios das atividades sinérgicas com DBAn + Bz foram realizados utilizando o método checkerboard descrito por Brilhante (2018) com adaptações. Para isso foi utilizado placas com 96 poços, onde cada poço contém uma combinação única de diferentes concentrações de DBAn + Bz.

A resposta de cada ensaio foi medida como a porcentagem de células viáveis após o tratamento com as drogas, uma porcentagem frequentemente chamada de taxa de inibição. Para determinar o efeito combinado de duas drogas, foi utilizado o modelo de independência de Bliss, calculado através do software Combineft versão 2.021 (Cancer Research UK Cambridge Institute, Cambridge, Reino Unido). Esse software de código aberto, analisa e classifica combinações de acordo com seus efeitos (Di Veroli *et al.*, 2016).

O modelo de Bliss permite prever a probabilidade entre uma combinação de substâncias de forma independente, sem ocorrer interação, e uma ação conjunta de

perturbações independentes, mas concorrentes, das substâncias individuais. A resposta é calculada como o produto das respostas individuais das substâncias, de acordo com a equação abaixo:

$$\hat{y}_{ab} = y_a + y_b - y_a y_b, 0 \leq y_i \leq 1 \quad i = a, b \text{ ou } ab$$

onde y_a e y_b são as taxas de inibição observadas com a droga X sozinha na dose “a” e a droga Y sozinho na dose “b”. Se a taxa de inibição observada y_{ab} na dose de combinação (da,db) da droga X e a droga Y é maior que a taxa de inibição prevista de Bliss \hat{y}_{ab} , o efeito da combinação de drogas é pensado como sinergismo naquela combinação de dose específica (da,db) (Bliss, 1956; ZHAO, 2014).

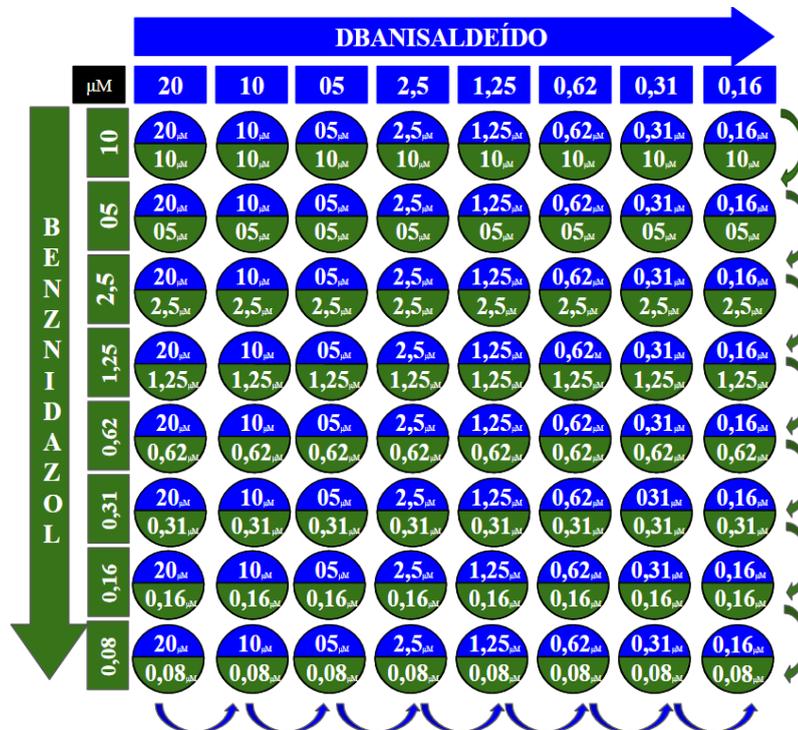
Os valores das concentrações da DBAn e Bz utilizadas nos ensaios *in vitro* foram determinadas previamente. A partir disso, foram selecionadas as menores concentrações sinérgicas para o tratamento das células, determinadas pelo modelo de Bliss. Os ensaios foram realizados em duplicata, em dois experimentos independentes.

4.9.1 Sinergismos DBAn + Bz em células LLC-MK2

Para a avaliação da citotoxicidade do DBAn, células LLC-MK2 foram transferidas para placas estéreis de 96 poços (10^5 céls/mL) em meio Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) a 10% de SBF e 37°C em atmosfera com 5% de CO₂ por 24 horas para permitir a adesão das células.

As células foram tratadas em placas de 96 poços com diferentes combinações seriadas das substâncias. Na horizontal, DBAn foi adicionado e diluído nas concentrações: 20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31 e 0,16 μ M, de forma decrescente da esquerda para direita da placa. Na vertical, Bz foi diluído nas concentrações: 10; 5; 2,5; 1,25; 0,62; 0,31; 0,16 e 0,08 μ M, da parte superior para inferior, obtendo-se um tabuleiro de damas 8 x 8 (Figura 23). Como controle positivo utilizou-se DBAn e Bz nas mesmas concentrações em poços individuais. Em seguida, 100 μ L do meio da cultura foram retirados, 10 μ L de uma solução de MTT a 2,5 mg/mL em PBS foram acrescentados e, 4h depois, foram adicionados 90 μ L do agente surfactante dodecilsulfato de sódio (SDS) (10% em HCl 0,01N). Após 17h de incubação para solubilização dos cristais de formazan, a placa foi lida em espectrofotômetro (Asys Expert Plus®) a 570nm. Foram feitos no mínimo dois experimentos.

Figura 23 - Representação esquemática do ensaio de Sinergismos DBAn + Bz em células LLC-MK2



Fonte: Elaborado pelo autor

4.9.2 Sinergismos DBAn + Bz em formas epimastigotas

Formas epimastigotas (10^6 parasitos/mL) foram incubadas em placas de 96 poços com combinações diferentes em concentrações seriadas de DBAn (intervalo de 20 - 0,16 μ M) e Bz (intervalo de 10 - 0,08 μ M), obedecendo a ordem de 8 x 8 (desenho de tabuleiro xadrez), total de 64 poços. Essas mesmas concentrações do DBAn e Bz foram colocadas em diferentes poços separadamente para obter-se os grupos controle das concentrações sinérgicas (figura 23). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT com a leitura da placa realizada em espectrofotômetro (Asys Expert Plus®) a 570nm. O experimento foi realizado em duplicata.

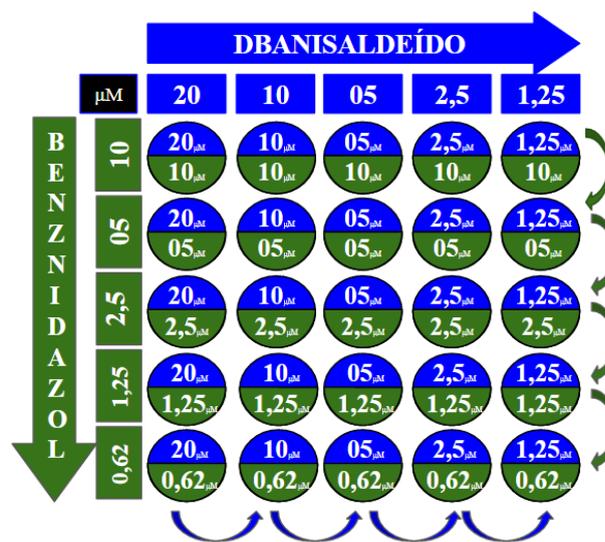
4.9.3 Sinergismos DBAn + Bz em formas tripomastigotas

Foi realizado o plaqueamento na concentração de 1×10^6 cél/mL de formas tripomastigotas em placa de 96 poços em meio DMEM 10% suplementados com soro bovino fetal e tratadas com combinações diferentes em concentrações seriadas de DBAn (intervalo de

20 - 1,25 μM) e Bz (intervalo de 10 - 0,62 μM), obedecendo a ordem de 5 x 5 (desenho de tabuleiro xadrez). DBAn e Bz foram testados nas mesmas concentrações individualmente para controle positivo (figura 24).

A placa foi incubada em atmosfera de 5% de CO_2 a 37 $^\circ\text{C}$ por 24 horas. Para a quantificação dos parasitos, foi utilizada a câmara de Neubauer sendo feita a contagem nos cinco quadrantes centrais, utilizando o microscópio óptico. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes.

Figura 24 - Representação esquemática do ensaio de Sinergismos DBAn + Bz em formas tripomastigotas



Fonte: Elaborado pelo autor

4.10 Análise estatística

Todos os experimentos foram realizados em triplicada, com $n=3$. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão médio sendo comparados utilizando ANOVA, com pós-teste de Dunnet e $p < 0,05$ como critério de significância. Estas análises foram feitas utilizando os softwares Microsoft Office® Excel 2016 e GraphPad Prism® versão 5.0.

Para os experimentos do sinergismo, foi utilizado o software Combenefit, com base no modelo de Bliss.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Determinação estrutural da molécula (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn)

No espectro de ^1H RMN pode-se observar em 6,95 (H_α) e 7,69 (H_β) ($J = 15,9$ Hz) dois dubletos referentes aos hidrogênios α, β insaturados, cuja constante de acoplamento (J) confirma a estereoquímica E da dupla ligação. Os sinais em 6,92 (d, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{2/6}$) e 7,56 (d, $J = 8,7$ Hz, $\text{H}_{3/5}$) são referentes aos hidrogênios aromáticos. No espectro de RMN ^{13}C tem-se o sinal referente a carbonila α, β insaturada em 188,9. A cetona absorve em 203,8, porém, a presença da insaturação α, β causa um deslocamento para campo alto e a causa provável é a deslocalização de carga pelo anel benzênico ou pela ligação dupla que torna o carbono da carbonila menos deficiente de elétrons. Os carbonos olefinicos α e β são observados em 127,7 e 142,8. Em 161,7 (C-4), 130,2 (C-1), 123,6 (C-3/5), 114,5 (C-2/6) são referentes aos carbonos aromáticos (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de RMN ^1H e ^{13}C do curcuminóide (1E,4E)-1,5-bis(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn) em CDCl_3 . Os deslocamentos químicos em δ_{C} e δ_{H} estão em ppm.

C	δ_{C}	δ_{H}
1	130,2	
2/6	114,5	6,92 (d, $J = 8,7$ Hz)
3/5	123,6	7,56 (d, $J = 8,7$ Hz)
4	161,7	
C_α	127,7	6,95 (d, $J = 15,9$ Hz)
C_β	142,8	7,69 (d, $J = 15,9$ Hz)
$\text{C}=\text{O}$	188,9	
OCH_3	55,5	3,83 (s)

Fonte: Elaborado pelo autor

5.2 Docking molecular

A análise do docking teve o objetivo de demonstrar um possível mecanismo de ação da molécula DBAn sobre o *T. cruzi*, através da interação com suas principais enzimas: DBAn-TcGAPDH, DBAn-TcTR e DBAn₃-TcCr. Assim como também, comparar com os sítios de ligação dos ligantes específicos de cada enzima.

A análise da energia de afinidade das três enzimas (TcGAPDH, TcTR e TcCr), com a molécula da DBAn, demonstrou os seguintes resultados: -7,3, -8,0 e -6,9 kcal/mol, respectivamente. Esses valores satisfazem os parâmetros dos complexos formados nas simulações. Destacando ainda, que a molécula do estudo obteve valores de AG inferiores em relação ao Bz e os complexos enzima-inibidor, exceto no complexo BRZ-TcGAPDH, cujo valor de AG foi -7,9 kcal/mol. A medida da distância média entre os átomos dos ligantes, obteve resultados mais próximos de 2Å, no Bz e nas três complexos enzimas-inibidor, enquanto que a molécula DBAn obteve resultados mais distantes quando complexada separadamente nas três enzimas com valores de RMSD: DBAn-TcGAPDH: 0,731 Å, DBAn-TcTR: 1,708 Å e DBAn-TcCr: 0,443 Å (tabela 3).

Tabela 3 - Dados de energia de afinidade e valores de RMSD dos complexos formados pela molécula DBAn com as enzimas TcCr, TcGAPDH e TcTR.

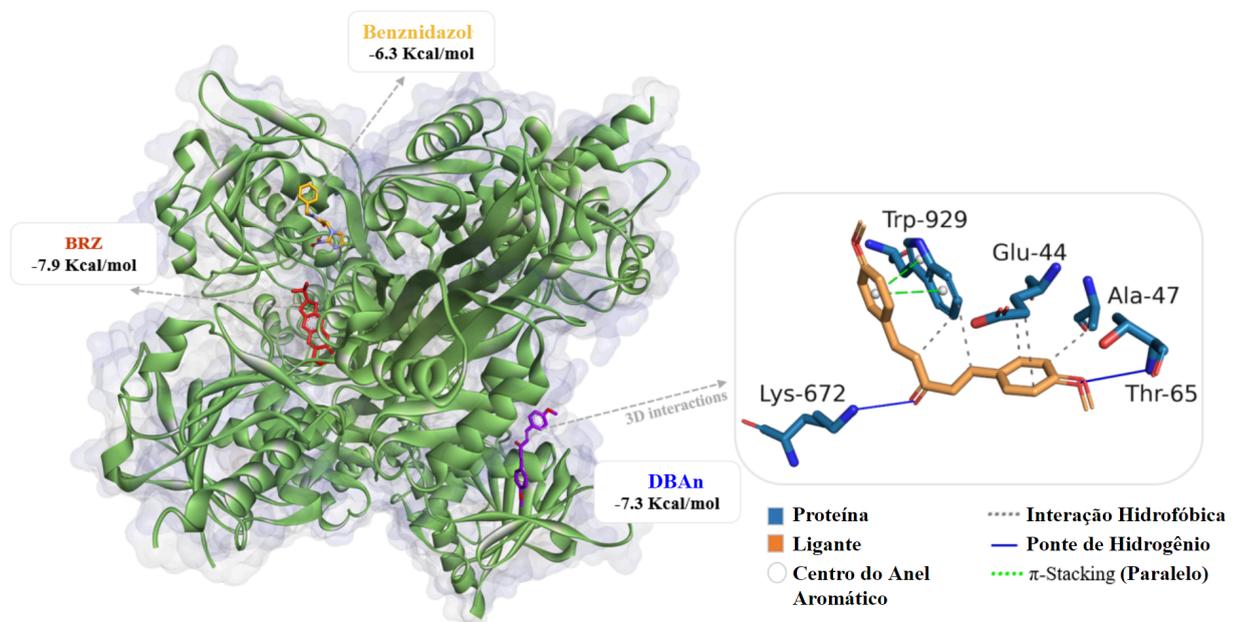
Ligante / Enzimas	TcGAPDH		TcTR		TcCr	
	ΔG (kcal/mol ⁻¹)	RMSD (Å)	ΔG (kcal/mol ⁻¹)	RMSD (Å)	ΔG (kcal/mol ⁻¹)	RMSD (Å)
DBAn	-7,3	0,731	-8,0	1,708	-6,9	0,443
Bz	-6,3	1,758	-7,4	1,352	-6,1	1,591
* BRZ	-7,9	1,920	-	-	-	-
* QUM	-	-	-6,0	1,822	-	-
* KB2	-	-	-	-	-5,9	1,185

Legenda: *ligante co-cristalizado (redocking); BRZ: 6-(1,1-dimetiladil)-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-7h-furo[3,2-g]chromen-7-ona; Bz: benznidazol; QUM: mostarda de quinacrina; KB2: (3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimetil-1-[(quinolin-6-ilmetil)amino]propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-il)heptan-2-ona; RMSD (Root Mean Square Deviation).

Fonte: Elaborado pelo autor.

As simulações do complexo DBAn-TcGAPDH (Fig. 25), demonstraram que a DBAn formou ligações hidrofóbicas com os resíduos de aminoácidos Glu 44A, Ala 47A, Trp 929D; ligações de hidrogênio com Thr 65A, Lys 672C e π -stacking com Trp 929D. Para o Bz ocorreu duas interações hidrofóbicas (Ile 731C, Glu 10 54C), duas ligações de hidrogênio (His 912C e Ser 95C) e uma π -stacking (His 912C). O redocking do complexo BRZ-TcGAPDH expôs interações hidrofóbicas com Thr 199C e Asn 335C. Pontes de hidrogênio com Cys 166C e Thr 167C e um salt bridges com His 194C (Tabela 4).

Figura 25 - Complexo de interação da enzima TcGAPDH com os ligantes e interações do ligante DBAn com o receptor.



Fonte – Elaborado pelo autor.

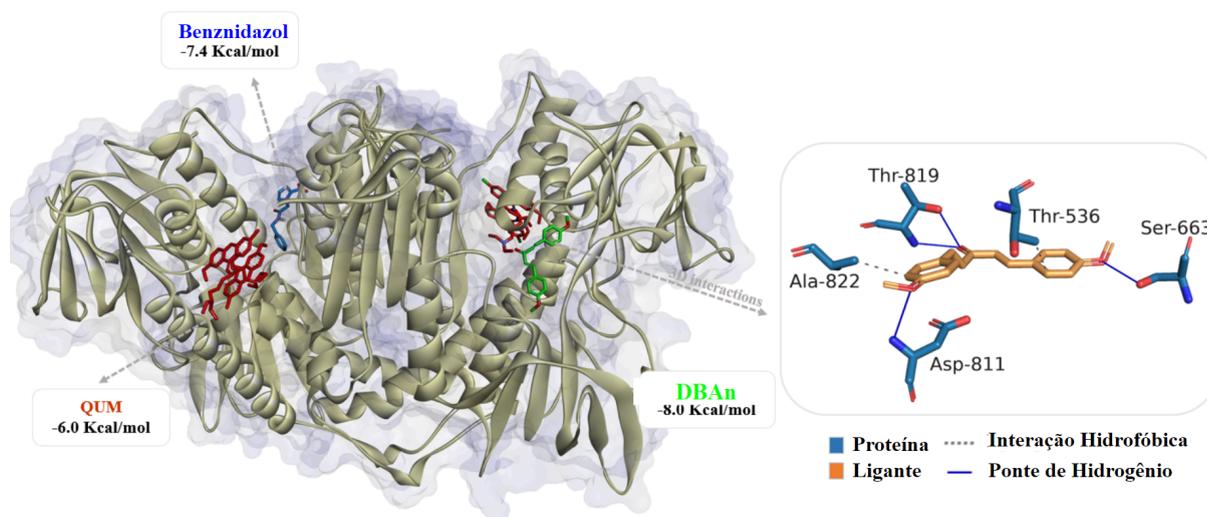
Tabela 4 - Interações entre a DBAn, Bz e BRZ com TcGAPDH.

Ligantes	Receptor	Interação	Distância (Å)	Receptor	Interação	Distância (Å)
DBAn	Glu 44A	Hidrofóbica	3.95	Trp 929D	Hidrofóbica	3.61
	Glu 44A	Hidrofóbica	3.69	Thr 65A	Ligação de H	2.84
	Ala 47A	Hidrofóbica	3.65	Lys 672C	Ligação de H	2.48
	Trp 929D	Hidrofóbica	3.87	Trp 929D	π -stacking	3.83
Bz	Ile 731C	Hidrofóbica	3.72	Ser 965C	Ligação de H	3.17
	Glu 1054C	Hidrofóbica	3.64	His 912C	π -stacking	4.13
	His 912C	Ligação de H	3.48			
BRZ*	Thr 199C	Hidrofóbica	3.90	Thr 167C	Ligação de H	3.05
	Asn 335C	Hidrofóbica	3.47	His 194C	Ponte de sal	3.95
	Cys 166C	Ligação de H	2.79			

Legenda: *ligante co-cristalizado (redocking) BRZ: 6-(1,1-dimetiladil)-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidro-7h-furo[3,2-g]chromen-7-ona; Bz: benznidazol.

As interações da DBAn com a Tripanotona Redutase (Figura 26) revelaram interações hidrofóbicas com Thr 53B e Ala 822B; ligações de hidrogênio com Ser 663B, Asp 811B, Thr 819B. Benznidazol apresentou três interações: hidrofóbica (Ile 200B), com hidrogênio (Thr 335B) e π -stacking (Phe 199B). As simulações do redocking do complexo QUM-TcTR, formou além de interações hidrofóbicas (Tyr 111B, Ile 339B) e ligações de hidrogênio (Tyr 111B), também ligação halógena (Ser 110B) (Tabela 5).

Figura 26 - Complexo de interação da enzima TcTR com os ligantes e interações do ligante DBAn com o receptor.



Fonte – Elaborado pelo autor.

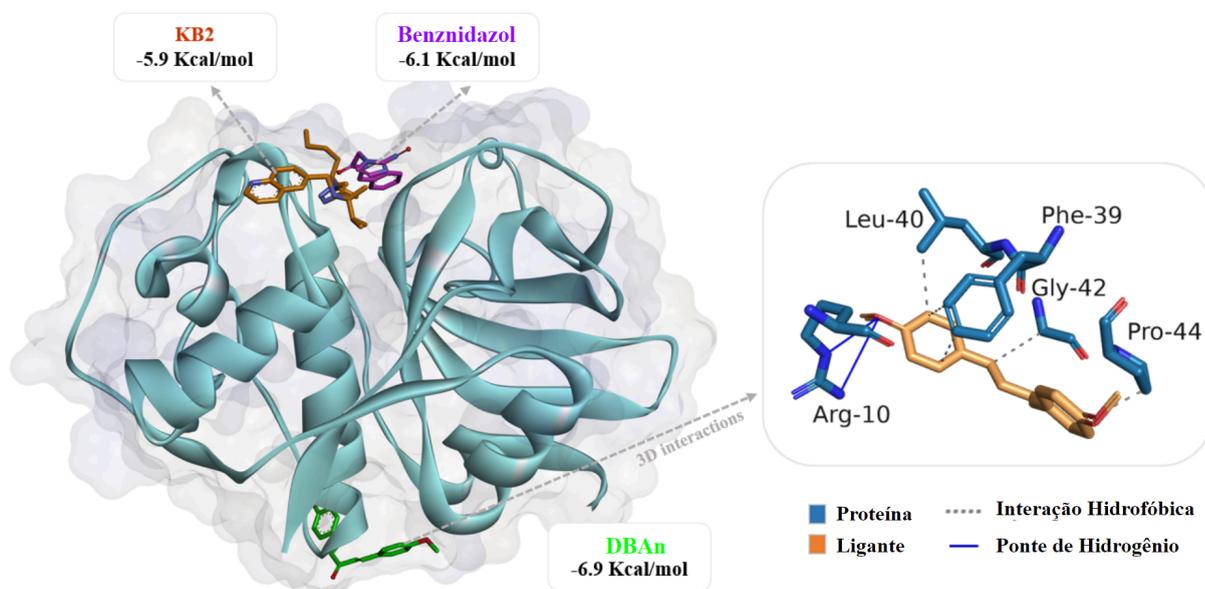
Tabela 5 - Interações entre a DBAn, Bz e QUM com TcTR

Ligantes	Receptor	Interação	Distância (Å)	Receptor	Interação	Distância (Å)
DBAn	Thr 536B	Hidrofóbica	3.42	Asp 811B	Ligação de H	2.97
	Ala 822B	Hidrofóbica	3.67	Thr 891B	Ligação de H	2.03
	Ser 663B	Ligação de H	2.33	Thr 891B	Ligação de H	2.12
Bz	Ile 200B	Hidrofóbica	3.60	Thr 335B	Ligação de H	2.76
	Thr 335B	Ligação de H	2.95	Phe 199B	π -stacking	5.00
QUM*	Tyr 111B	Hidrofóbica	3.32	Ser 100B	Ligação halogênica	3.15
	Ile 339B	Hidrofóbica	3.37			
	Tyr 111B	Ligação de H	3.22	Ser 100B	Ligação halogênica	3.61

Legenda: *ligante co-cristalizado (redocking) QUM: mostarda de quinacrina; Bz: benznidazol.

A interação do complexo DBAn-TcCr (Figura 27), formou interações hidrofóbicas com a DBAn nos resíduos: Phe 39A, Leu 40A, Gly 42A, Pro 44A; com o Bz interagiu como Trp 184A e o inibidor KB2 com Leu 67A. As ligações de hidrogênio ocorreram entre DBAn no resíduo Arg 10A; Bz com Gln 21A e com o inibidor KB2 as interações foram com Gln 19A, Cys 25A, Gly 66A. A π -stacking ocorreu apenas com o Bz no resíduo Trp 184A (Tabela 6).

Figura 27 - Complexo de interação da enzima TcCr com os ligantes e interações do ligante DBAn com o receptor.



Fonte – Elaborado pelo autor.

Tabela 6 - Interações entre a DBAn, Bz e KB2 com TcCr

Ligantes	Receptor	Interação	Distância (Å)	Receptor	Interação	Distância (Å)
DBAn	Phe 39A	Hidrofóbica	3.76	Pro 44A	Hidrofóbica	3.81
	Phe 39A	Hidrofóbica	3.44	Pro 44A	Hidrofóbica	3.78
	Leu 40A	Hidrofóbica	3.29	Arg 10A	Ligação de H	2.24
	Gly 42A	Hidrofóbica	3.99	Arg 10A	Ligação de H	3.22

Bz	Trp 184A	Hidrofóbica	3.52	Trp 188A	Hidrofóbica	3.99
	Trp 184A	Hidrofóbica	3.78	Gln 21A	Ligação de H	3.54
	Trp 184A	Hidrofóbica	3.67	Trp 184A	π -stacking	4.54
KB2*	Leu 67A	Hidrofóbica	3.88	Cys 25A	Ligação de H	2.18
	Leu 67A	Hidrofóbica	3.59	Gly 66A	Ligação de H	1.87
	Gln 19A	Ligação de H	2.28	Gly 66A	Ligação de H	2.27

Legenda: *ligante co-cristalizado (redocking)KB2:(3S)-3-(4-((1S)-1,2-dimetil-1-[(quinolin-6-ilmetil)amino]propyl)-1H-1,2,3-triazol-1-il)heptan-2-ona; Bz: benznidazol.

5.3 Parâmetros farmacocinéticos

A análise da predição *in silico* das propriedades farmacocinéticas mostraram que o DBAn não violou nenhuma das regras dos cinco de Lipinski, mostrando ser uma molécula lipossolúvel além de apresentar uma boa absorção oral (Tabela 7).

Tabela 7 - Propriedades físico-químicas calculadas da DBAn e Bz.

Molécula	MM g/mol	nALH	nDLH	miLogP	TSPA Å ²
Valor desejável	<500	<10	<5	<5	≤140
DBAn	294,34	3	0	3,46	35,53
Bz	260,25	4	1	0,37	92.74

Legenda - MM: massa molecular; nALH: número de grupos aceptores de ligação hidrogênio; nDLH: número de grupos doadores de ligação hidrogênio; miLogP: coeficiente de partição octanol-água; TPSA: área de superfície polar topológica.

Os parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) *in silico* mostraram que a DBAn teve uma boa probabilidade de ser uma molécula com uma boa absorção, a permeabilidade Caco-2 foi de 1.357. Também apresentou uma ótima absorção intestinal 97%. A absorção epitelial teve um $\log k_p > 2,587$, sendo considerada baixa absorção. Os resultados mostraram que o DBAn possui um baixo valor de distribuição em relação ao Bz, assim como não possui uma capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e pouca possibilidade de penetrar no sistema nervoso central.

A DBAn mostrou ser um inibidor para a maioria dos citocromos P450 testadas, podendo ser metabolizada no fígado. A excreção do DBAn mostrou ser menor quando comparada ao Bz. Os resultados toxicocinéticos mostraram que o DBAn não é capaz de inibir nenhuma hERG, não ser tóxica e não ser capaz de causar hepatotoxicidade (Tabela 8).

Tabela 8 - Propriedades ADMET do DBAn.

PARÂMETRO	DBAn	Bz	Referência
Absorção			
Solubilidade aquosa (log mol/L)	-5.049	-2.723	-
Permeabilidade Caco-2 (log Papp em 10^{-6} cm/s)	1.357	0.655	> 0,90
Absorção intestinal humana (%)	97.112	75.494	> 30
Absorção epitelial (log Kp)	-2,587	-2,735	baixa > -2,5
Substrato Glicoproteína P	NÃO	SIM	S/N
Inibidor glicoproteína PI	SIM	NÃO	S/N
Inibidor glicoproteína P II	NÃO	NÃO	S/N
Distribuição			
Volume de distribuição (humana) (log L/kg)	-0,082	0,234	alto > 0,45
Fração não ligada	0	0,325	-
Permeabilidade BHE (log BH)	-0,052	-0,863	> 0,3
Permeabilidade SNC (log PS)	-1,387	-2,69	> -2
Metabolismo			
Substrato CYP2D6; CYP2D6	NÃO	NÃO	S/N
Substrato CYP3A4; CYP1A2; CYP2C19; CYP2C9; CYP3A4	SIM	NÃO	S/N
Excreção			
Substrato renal OCT2	NÃO	NÃO	S/N
Eliminação total (log mL/min/Kg)	0,196	0,519	-
Parâmetros toxicocinéticos			
Mutagenicidade (Teste de Ames)	NÃO	SIM	NÃO
Dose máxima tolerada (log mg/Kg/dia)	0,842	1,029	

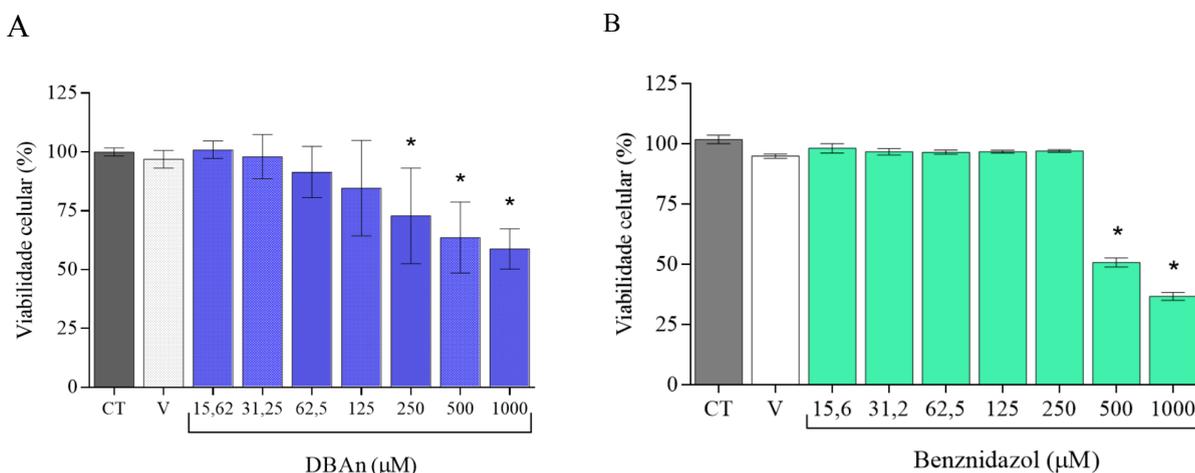
Inibidor hERG I/ hERG II	NÃO	NÃO
DL ₅₀ (mg/Kg)	2.165	2.265
LOAEL (log mg/Kg/dia)	2.247	1.682
Hepatotoxicidade	NÃO	SIM

Legenda - Papp: coeficiente de permeabilidade aparente; Kp: constante de permeabilidade; BHE: barreira hematoencefálica; SNC: sistema nervoso central; PS: área de permeabilidade de superfície; OCT2: transportador de cátions orgânicos; AMES: ensaio da capacidade de um composto químico para induzir mutações no DNA; DL: dose letal; LOAEL: nível de efeito adverso mais baixo observado.

5.4 Avaliação da citotoxicidade da DBAn em células hospedeiras.

Células LLC-MK2 foram utilizadas para avaliar a citotoxicidade da DBAn após 24h de exposição em diferentes concentrações (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 µM). Esse teste de citotoxicidade foi realizado pelo ensaio com MTT para detectar a viabilidade celular tendo como base o metabolismo oxidativo. Houve efeito citotóxico apenas entre as concentrações de 1000µM a 250 µM, com percentual de variação de 58,79% a 72,87%. Nessas mesmas concentrações o Bz variou de 36,58% e 85,35% (Figura 28).

Figura 28 - Citotoxicidade do DBAn (A) e Bz (B) sobre a viabilidade de células LLC-MK2, após 24h de tratamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Viabilidade celular em células LLC-MK2 tratadas com DBAn (A) e Benznidazol (B); CT: Controle; V: Veículo (DMSO 0,5%). Os dados são expressos por média ± erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em triplicata da quantificação e representam o percentual de viabilidade celular. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste *Dunnett*) (* $p < 0.05$. vs. controle).

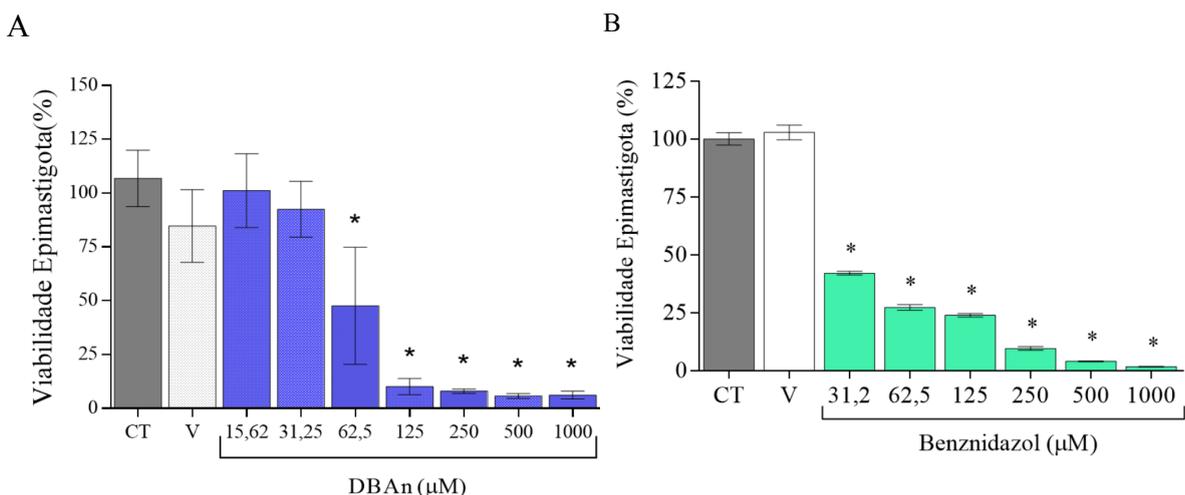
O DBAn apresentou uma CC_{50} de 1277 μM , enquanto o Bz foi de 616 μM . Os valores de CC_{50} , foram utilizados para calcular o Índice de Seletividade (IS), representando a seletividade da DBAn sobre o *T. cruzi* em relação à célula hospedeira de um vertebrado. O IS encontrado foi de 36,01, a partir desse resultado foram escolhidas as concentrações de trabalho para os ensaios tripanocidas (Dados mostrados na tabela 3).

5.5 Avaliação da atividade do DBAn em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para avaliar a ação do DBAn sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi realizado o tratamento nas concentrações entre (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6 μM) durante 72 horas. O ensaio foi realizado pela contagem dos epimastigotas na câmara de Neubauer.

O efeito inibitório nas formas epimastigotas está representada através da percentagem da viabilidade celular, em em 72h observou-se uma viabilidade entre 6,10% - 101,17% (Fig. 29A) sendo considerada a quantificação de 100%. Foram consideradas doses significativas entre 1000 e 62,5 μM . Para o Bz (Fig. 29B) o percentual de epimastigotas no tempo de 72h, foi estimado em 1,7 e 42,1%. Os valores correspondentes de IC_{50} encontram-se na tabela 3.

Figura 29 - Efeito citotóxico do DBAn (A) e Bz (B) sobre a forma epimastigota de *T. cruzi* após 72h de tratamento.



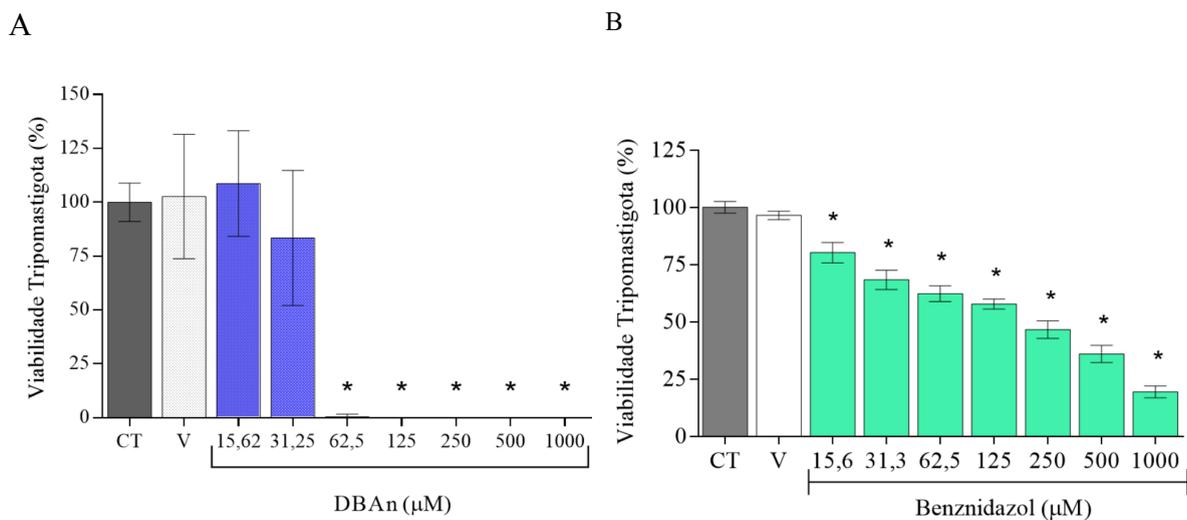
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Viabilidade celular em formas epimastigotas tratadas com DBAn (A) e Benznidazol (B). (CT: Controle), V: Veículo (DMSO 0,5%). Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em triplicata da quantificação e representam o percentual de viabilidade celular. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett) (* $p < 0.05$. vs. controle).

5.6 Avaliação da atividade da DBAn sobre as formas tripomastigota de *T. cruzi*

O efeito citotóxico da DBAn foi avaliado sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi* nas concentrações de (1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25 e 15,6 μM), após 24h de tratamento. O ensaio foi realizado pela contagem dos tripomastigotas em câmara de Neubauer. O DBAn reduziu a viabilidade das formas tripomastigotas nas concentrações de 1000 a 62,5 μM testadas, quando comparadas com o grupo controle, chegando a 100% de inibição (Fig. 30A). O Bz apresentou efeito nas mesmas concentrações testadas abaixo de 68,36%. O efeito do DBAn sobre as formas tripomastigotas apresentou uma LC_{50} de 35,6 μM , enquanto o Bz foi de 256 μM (Fig. 30B).

Figura 30 - Efeito citotóxico da DBAn (A) e Bz (B) sobre a forma tripomastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Viabilidade celular em formas tripomastigotas tratadas com DBAn (A) e Benznidazol (B) (CT: Controle), V: Veículo (DMSO 0,5%). Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em triplicata da quantificação e representam o percentual de viabilidade celular. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett) (* $p < 0.05$. vs. controle).

5.7 Relação da atividade do DBAn x Bz sobre as formas tripomastigotas e epimastigotas do *T. cruzi* e em células LLC-MK2.

A molécula do DBAn foi capaz de inibir 50% da cultura de epimastigota em 61,81 μM em 72h de tratamento. Enquanto que no Bz a IC_{50} foi de 16,5 μM em 72h. Para as formas tripomastigota a LC_{50} da DBAn apresentou ser mais potente 7 vezes em comparação com o Bz. Já nas células hospedeiras LLC-MK2 a CC_{50} da DBAn foi de 1277, demonstrando que a mesma não possui efeito tóxico para essas células hospedeiras, mesmo nas altas concentrações testadas (Tabela 9).

Para calcular o IS, foram utilizados os dados de LC_{50} dos tripomastigotas e CC_{50} das células LLC-MK2. Como resultado, a DBAn apresentou melhor IS de 36, enquanto que o Bz foi de apenas 2,4, ou seja, a DBAn apresentou IS de 15 vezes melhor que o medicamento de referência.

Tabela 9 - Relação da atividade da DBAn x Bz.

Célula	Tempo (h)	Resultado ($\mu\text{M} \pm \text{D.P.}$)	
		DBAn	Benznidazol
Epimastigota (IC_{50})	72	61,81 \pm 0,83	16,5 \pm 3
Tripomastigota (LC_{50})	24	35,46 \pm 0,23	256 \pm 77
LLC-MK2 (CC_{50})	24	1277 \pm 348	616 \pm 51
IS	24	36,01	2,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

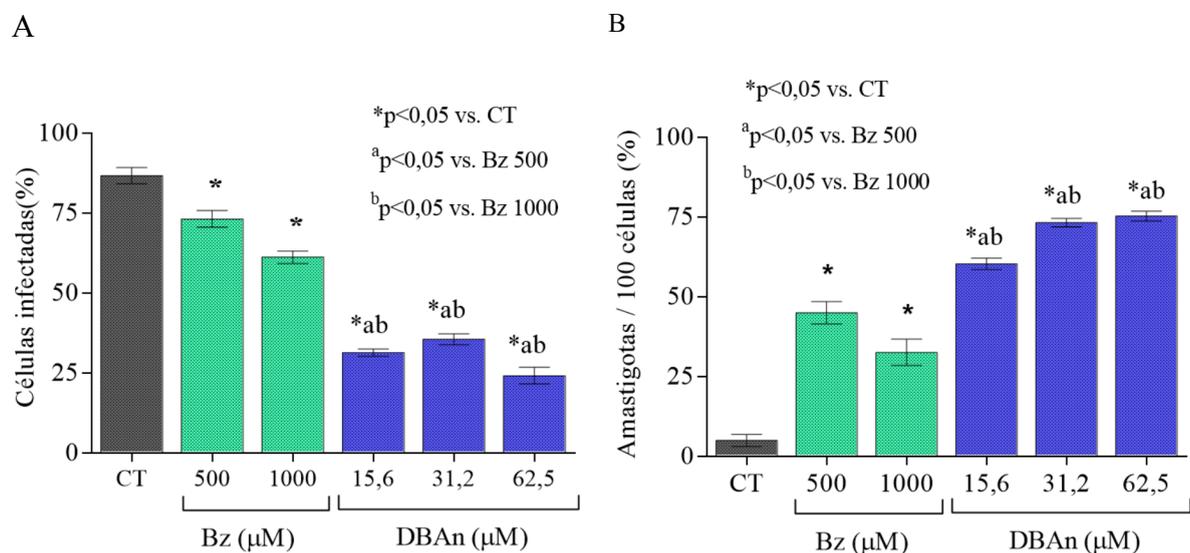
Legenda: IC_{50} = inibição do crescimento a 50%; LC_{50} = concentração inibitória a 50%; CC_{50} = concentração a 50% de citotoxicidade; IS = Índice seletividade; D.P. = Desvio padrão. Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em triplicata da quantificação e representam o percentual de viabilidade celular. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett) (* $p < 0.05$. vs. controle).

5.8 Avaliação da atividade do DBAn sobre as formas amastigotas de *T. cruzi*

A investigação de formas intracelulares de *T. cruzi*, amastigotas, foi realizada a partir da infecção de células LLC-MK2, com formas tripomastigotas. O ensaio foi realizado pela contagem do número de células infectadas e contagem de amastigotas em lâminas fixadas e coradas, em seguida visualizadas no microscópio óptico.

Os resultados mostraram que as concentrações 62,5; 31,25 e 15,6 μM de DBAn foram capazes de diminuir de forma significativa a infecção das células hospedeiras com percentuais de 24,12%, 35,53% e 31,33% respectivamente, quando comparadas aos Bz 61,13% e 73,15% nas concentrações de 1000 e 500 μM (Fig. 31A). Em relação à atividade anti-amastigotas nas células infectadas, ocorreu um aumento percentual de 75,22%, 73,21% e 60,33% nas concentrações 62,5; 31,25 e 15,6 μM , respectivamente, enquanto o Bz apresentou percentuais de 32,55% e 44,94% nas concentrações de 1000 e 500 μM (Fig. 31B). Essas concentrações de DBAn foram escolhidas com base na LC_{50} reduzida nas formas tripomastigotas.

Figura 31 - Efeito citotóxico da DBAn (A) e Bz (B) sobre a forma amastigota de *T. cruzi* após 24h de tratamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Percentual de células infectadas (A); Atividade anti-amastigotas por 100 células infectadas (B) tratadas com DBAn e Benznidazol. (CT: Controle) Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em triplicata da quantificação e representam o percentual de viabilidade celular. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett) (* $p < 0.05$. vs. controle).

5.9 Ensaios de citometria de fluxo

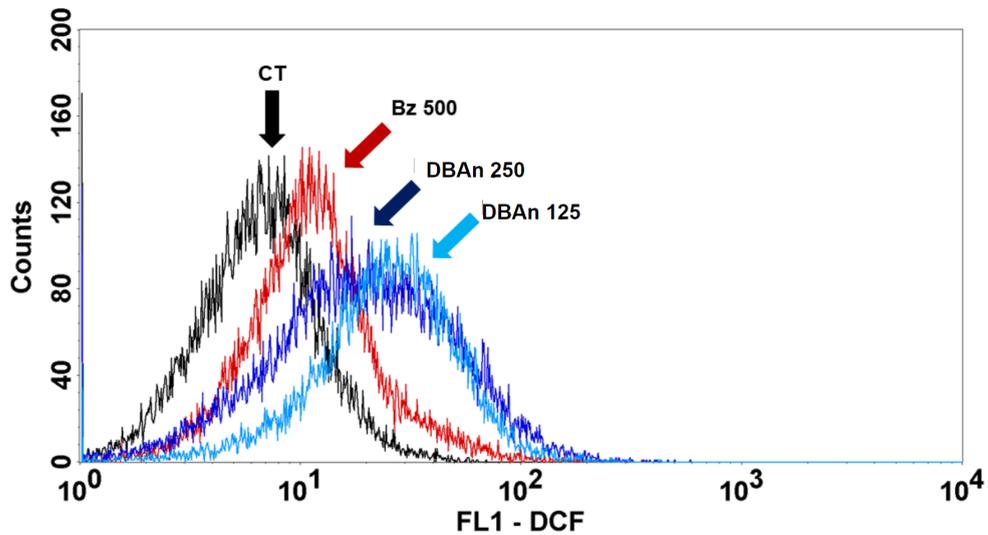
Em todos os ensaios de citometria de fluxo, a visualização das células foram demonstradas através de gráficos de pontos (dot plot) bidimensional, sendo analisados os seguintes parâmetros: tamanho, granulosidade e identificação das populações celulares. Também foram feitos histogramas e dot plot para análise em escala logarítmica de acordo com cada marcador fluorescente utilizado nos ensaios. Cada amostra foi lida em triplicata e, de cada uma, foram adquiridos 10.000 eventos (30.000 células/animal). Os valores referentes à produção de espécies reativas de oxigênio foram avaliados por meio da mediana da intensidade de fluorescência emitida pela população de células analisadas. Este valor é dado pelo aparelho e foi esta unidade utilizada para se avaliar a intensidade de fluorescência das células.

5.9.1 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) em formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo DBAn.

A análise de espécies reativas de oxigênio foi realizada após o período de incubação do DBAn com as formas epimastigotas de *T. cruzi* marcadas com DCFH₂-DA. Ao ser internalizado pelo parasito, o DCFH₂-DA é oxidado na presença de EROs, produzindo fluorescência.

Na Figura 32 é possível observar um aumento na produção de EROs, indicando um deslocamento para a direita dos grupos de parasitos tratados nas concentrações da DBAn (250 e 125 µM). A intensidade relativa de fluorescência teve um aumento bastante significativo, superior a 253% na maior concentração testada quando comparada com o grupo controle (Fig. 33). Quando comparada com Bz (500 µM), DBAn obteve um aumento de 52% na fluorescência em doses menores (250 e 125 µM). Esses resultados indicam uma produção de EROs induzido pela DBAn nos parasitos.

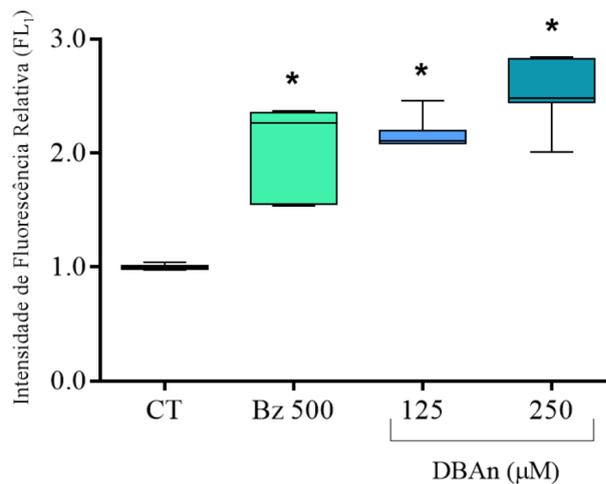
Figura 32 - Histograma da intensidade de fluorescência (FL1) após marcação com DCFH₂-DA nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com DBAn.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: O eixo X representa a intensidade DCF-DA, enquanto o eixo Y indica as contagens de células em intensidade de fluorescência correspondente. A linha preta é a interpretação de fluorescência do controle positivo. A linha vermelha corresponde ao Bz (500 μ M), linha azul claro corresponde ao DBAn (125 μ M), a linha azul escuro corresponde ao DBAn (250 μ M).

Figura 33 - Avaliação da produção de espécies reativas citoplasmáticas em epimastigotas por citometria de fluxo pelo DBAn.



Fonte: Elaborado pelo autor.

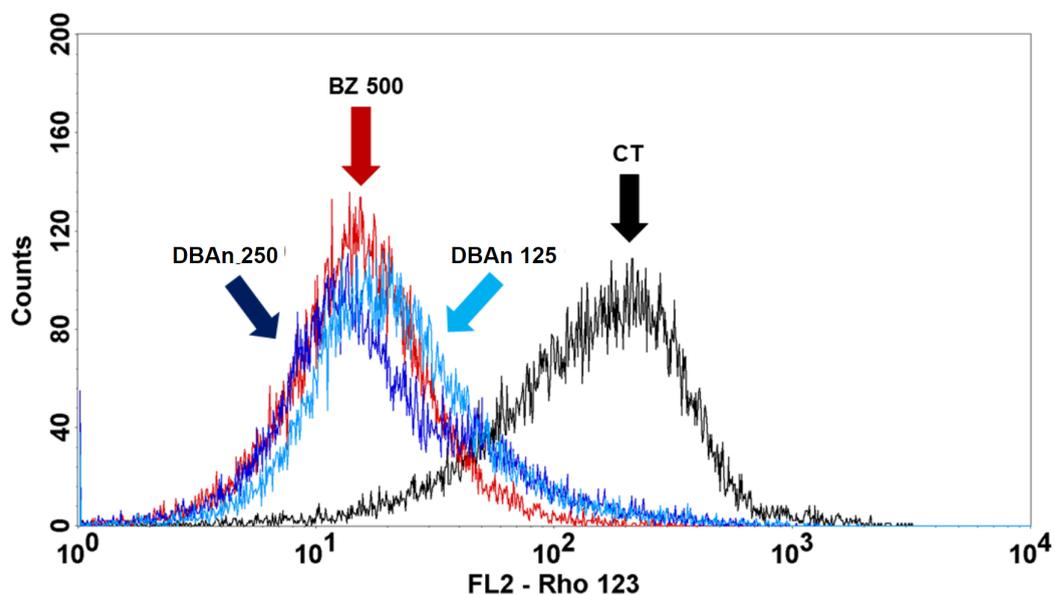
Legenda: Intensidade de fluorescência do DCFH₂-DA nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento com DBAn. CT (grupo controle); DBAn (125 e 250 μ M). Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em triplicata da quantificação e representam o percentual de viabilidade celular. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett) (* p <0.05. vs. controle).

5.9.2 Avaliação do potencial transmembrânico mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo DBAn.

A determinação de possíveis alterações na membrana mitocondrial ocasionadas pelo DBAn, foi realizada nas formas epimastigotas dos parasitos, tratados por 24h de incubação, marcados com rodamina (Rho-123), este fluoróforo se acumula no espaço intermembranar mitocondrial de células viáveis, analisadas por citometria de fluxo.

Nossos resultados mostraram uma redução significativa do potencial de membrana mitocondrial dos parasitos em 28% (deslocamento à esquerda) quando comparada ao grupo controle (Fig. 34), assim como é possível observar uma redução da intensidade de fluorescência vermelha (Fig. 35). A redução do potencial de membrana foi 10% maior quando comparadas com o Bz. Por se acumular apenas em mitocôndrias intactas, a diminuição da fluorescência indica que houve dano da membrana mitocondrial dos parasitos tratados com DBAn.

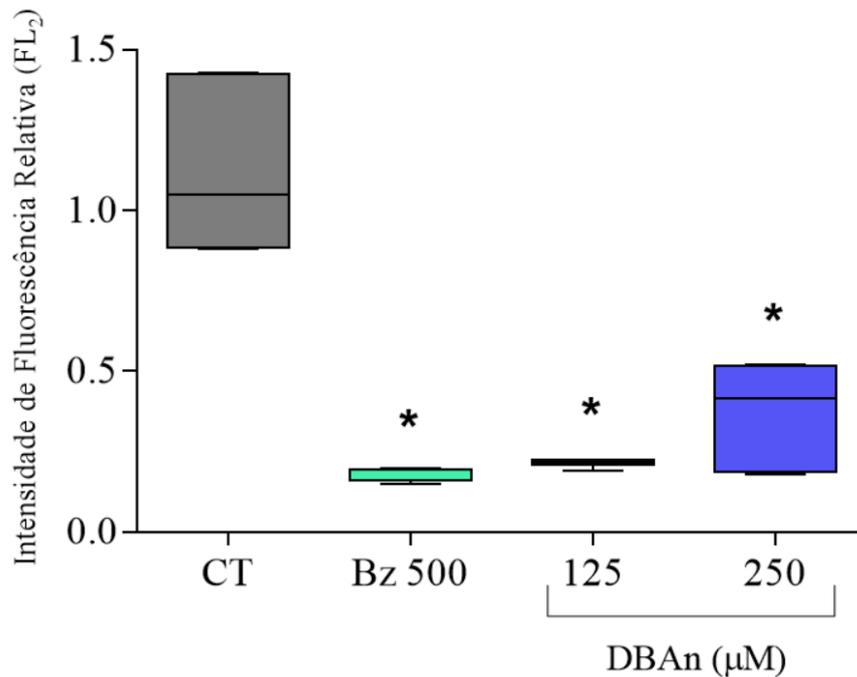
Figura 34 - Histograma da intensidade de fluorescência (FL2) após marcação com Rho-123 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24 horas de tratamento com DBAn.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: O eixo X representa a intensidade de fluorescência de Rho-123, enquanto o eixo Y indica as contagens de células em intensidade de fluorescência correspondente. A linha preta é a interpretação de fluorescência do controle positivo. A linha vermelha corresponde ao Bz (500 μM), linha azul claro corresponde ao DBAn (125 μM), a linha azul escuro corresponde ao DBAn (250 μM).

Figura 35 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial em epimastigotas de *T.cruzi* após 24h de tratamento com DBAn.



Fonte: Elaborado pelo autor

Legenda: Intensidade de fluorescência da Rho 123 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* após 24h de tratamento com DBAn. CT (grupo controle); DBAn (125 e 250 μ M). Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em triplicata da quantificação e representam o percentual de viabilidade celular. Análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA (pós-teste Dunnett) (* $p < 0.05$. vs. controle).

5.9.3 Avaliação do potencial necrótico/apoptótico em formas epimastigotas de *T. cruzi* pelo DBAn.

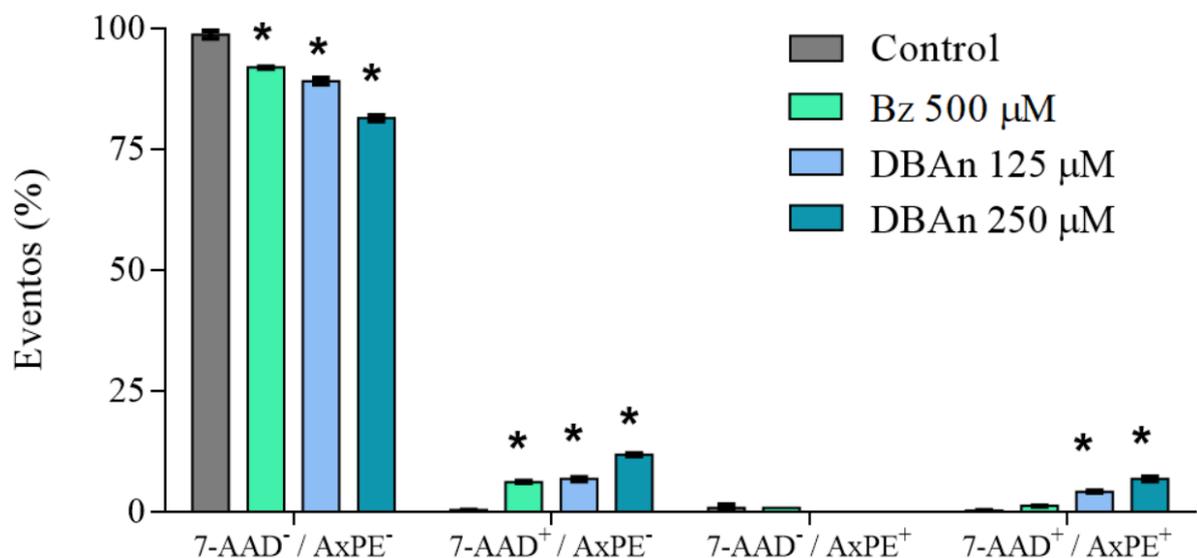
A avaliação do mecanismo de morte celular do DBAn é possível realizar através da detecção da externalização de fosfatidilserina e da perda de permeabilidade de membrana do parasito, para isso formas epimastigotas foram tratadas por 24h com DBAn, marcadas com 7-AAD (marcador de necrose) e Anexina Ax-PE (marcador de apoptose), sendo analisadas por citometria de fluxo.

Os dados revelaram um aumento no percentual da marcação com apenas (7-AAD+/AxPE-), assim como nas células viáveis para ambos os fluorocromos (7-AAD-/Ax-). Parasitos marcados apenas com 7-AAD (7-AAD+/Ax-), apresentaram percentuais de 6,70% e 11,80% nas concentrações de 125 e 250 μ M, respectivamente, enquanto que parasitos marcados apenas com Anexina V-PE (7-AAD-/Ax+), não apresentou

nenhuma alteração. O aumento da marcação com 7-AAD indica a perda da permeabilidade de membrana o que induziu a morte do parasito, sugerindo a ocorrência de necrose. Já para avaliar apoptose tardia marcadas duplamente (7-AAD+/Ax+) nos parasitos, revelaram percentuais significativos de 4,17% e 6,76%, nas mesmas concentrações testadas (125 e 250 μ M), quando comparados ao grupo controle (Fig. 36).

Na Figura 37 mostra os dados em forma de histogramas biparamétricos apresentados dois eixos: o eixo X mostra a marcação de células com Ax-PE e no eixo Y marcação com 7-AAD. A imagem ainda mostra a divisão de cada histograma em quadrantes: Quadrante inferior esquerdo: células viáveis (não-marcadas); quadrante inferior direito: células marcadas com Anexina V; quadrante superior esquerdo: células marcadas apenas com 7-AAD; quadrante superior direito: células marcadas duplamente com 7-AAD e Anexina V-PE. CT: Controle.

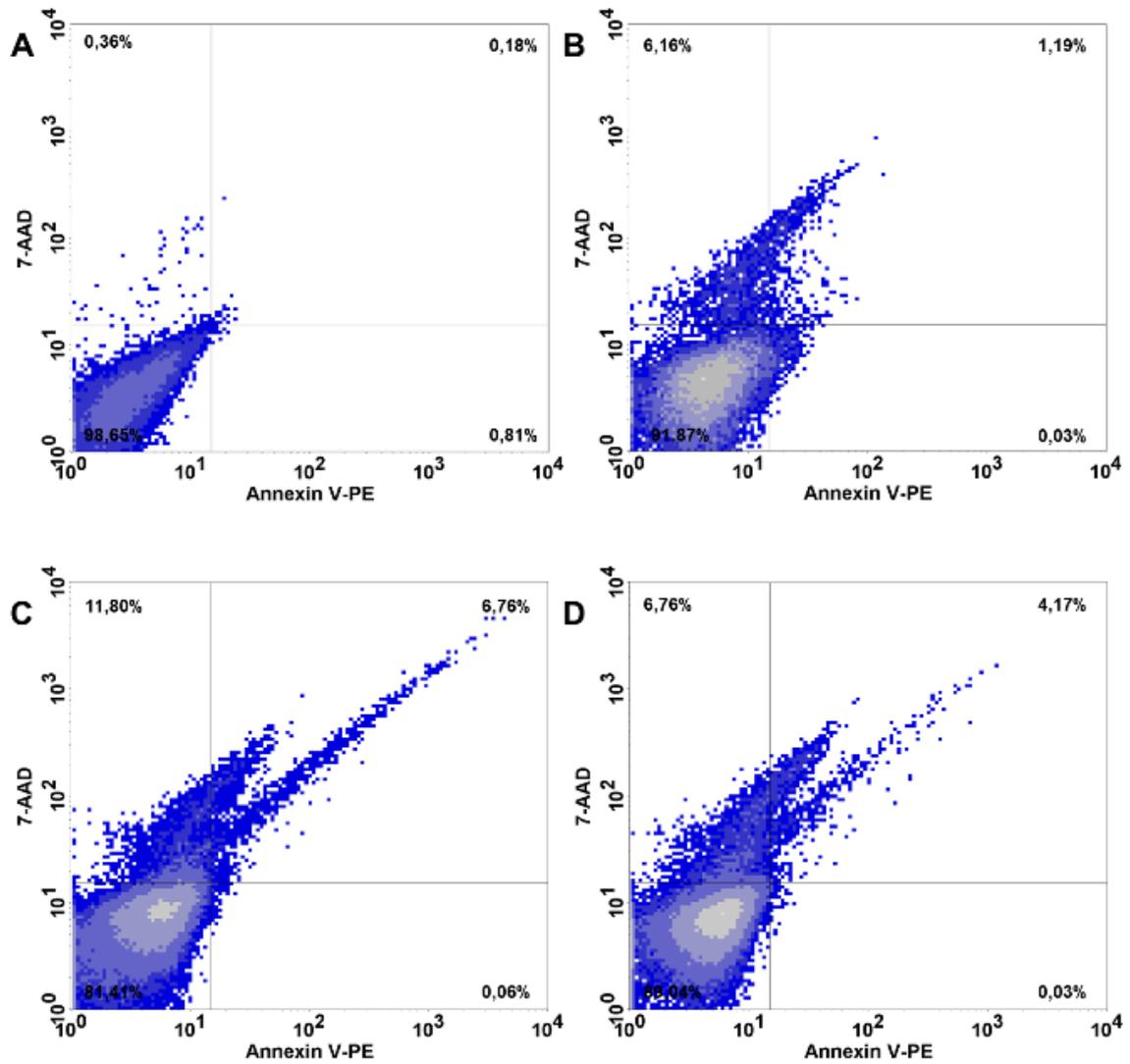
Figura 36 - Avaliação do mecanismo de morte celular do DBAn por apoptose e/ou necrose marcado por 7-AAD/Anexina V na cultura de formas epimastigota de *T. cruzi*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: 7-AAD-/Ax- = células viáveis; 7-AAD+/Ax- = células necróticas; 7-AAD-/Ax+ = células apoptóticas; 7-AAD+/Ax+ = apoptose tardia. Os dados foram expressos como média \pm EPM e avaliados por one-way ANOVA com pós-teste de Dunnet. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Figura 37 - Gráfico Density-plot do perfil necrótico/apoptótico induzido por DBAn, analisado por citometria de fluxo.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Dispersão de células por intensidade de marcação por anexina Ax-PE e 7-AAD. (A) Grupo controle; (B) Grupo tratado com Bz; (C) Grupo tratado com DBAn 250 μM; (D) Grupo tratado com DBAn 125 μM.

5.10 Avaliação da atividade sinérgica com DBAn + Bz

A avaliação da atividade sinérgica foi analisada pelo software CombeneFit, com base no efeito de combinação da DBAn+ Bz.

Os resultados foram demonstrados pelos gráficos de Mapeamento dos níveis de sinergia na superfície dose-resposta de combinação experimental, mostrando a percentagem de sinergismo para diferentes concentrações e combinações (Figuras 38-40) e níveis de sinergia em formato matricial, onde a distribuição de sinergia foi derivada da combinação dose-resposta e dose-resposta de referência.

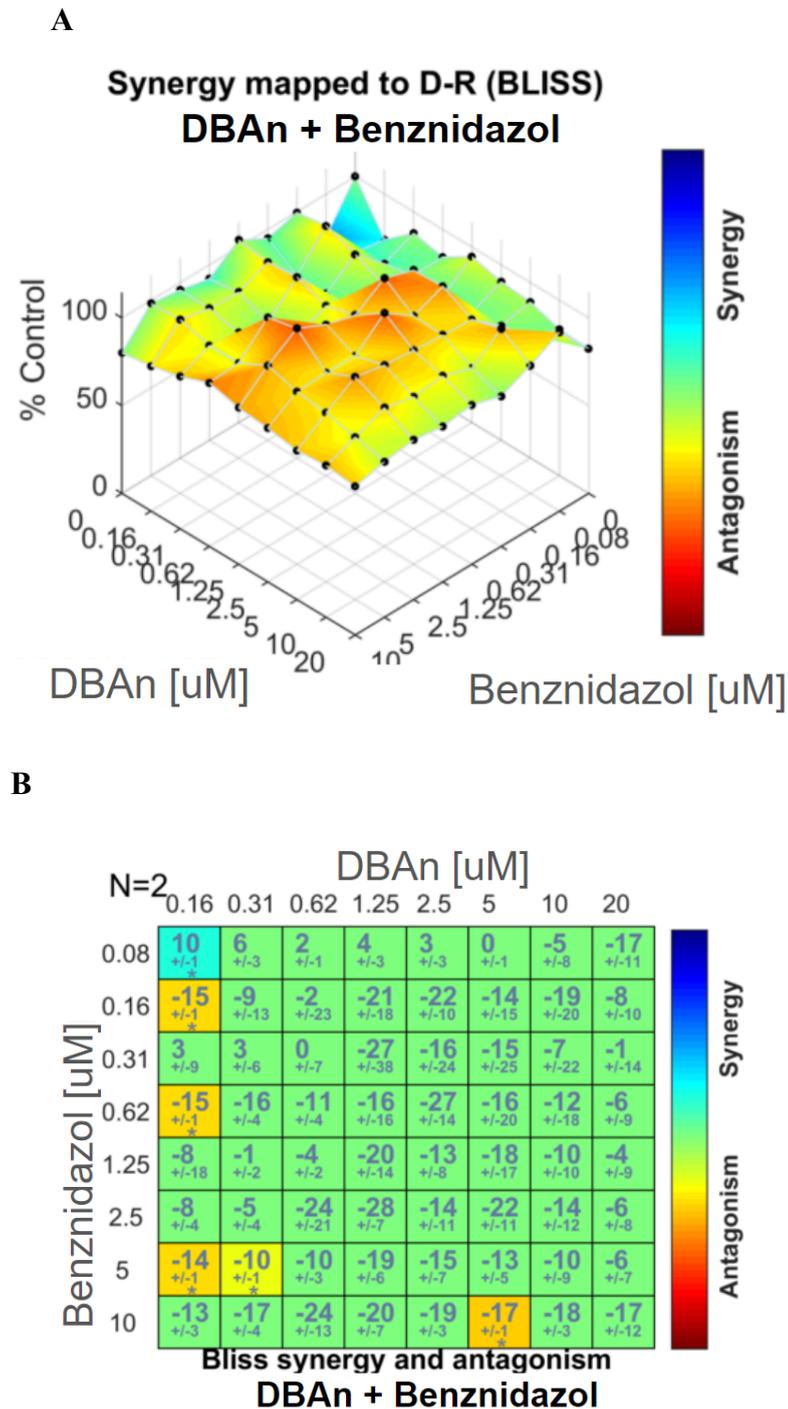
A pontuação observada refere-se aos níveis de sinergia e/ou antagonismo. As pontuações positivas significam que a combinação do DBAn e Bz é sinérgica, enquanto as pontuações negativas indicaram antagonismo (Figuras 38-40).

Nos resultados gráficos, também é possível visualizar cores para diferenciação da sinergia e/ou antagonismo, o azul representa as combinações sinérgicas, o verde é usado para a indiferença e o vermelho, o laranja e o amarelo indicam as combinações que resultaram em antagonismo.

5.10.1 Avaliação da atividade sinérgica com DBAn + Bz em células LLC-MK2.

Os resultados sinérgicos do DBAn e Bz em células LLC-MK2, não mostraram regiões de sinergismo significativo nas concentrações testadas, apresentando apenas um ponto sinérgico na concentração 0.16/0.08 μ M de DBAn/Bz. Nas demais concentrações, ocorreram regiões de antagonismo, revelando que essas combinações de DBAn+Bz não possuem um perfil de citotoxicidade considerável para as células LLC-MK2 (Fig. 38).

Figura 38 - Interações sinérgicas entre DBAn e Bz em células LLC-MK2.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Análise de superfície dose-resposta, mostrando o mapeamento dos níveis de sinergia na combinação experimental entre DBAn e Bz; (B) Distribuição de sinergia, em formato matricial, derivada da combinação dose-resposta e da dose-resposta de referência, entre DBAn e Bz. nível de significância estatística: (*) para um valor de p menor que 0,05, (**) para um valor de p menor que 0,01 e (***) para um valor de p menos de 0,001. Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em duplicata. Análise obtida pelo software Combenefit utilizando o modelo de Bliss.

5.10.2 Avaliação da atividade sinérgica com DBAn + Bz em formas epimastigotas

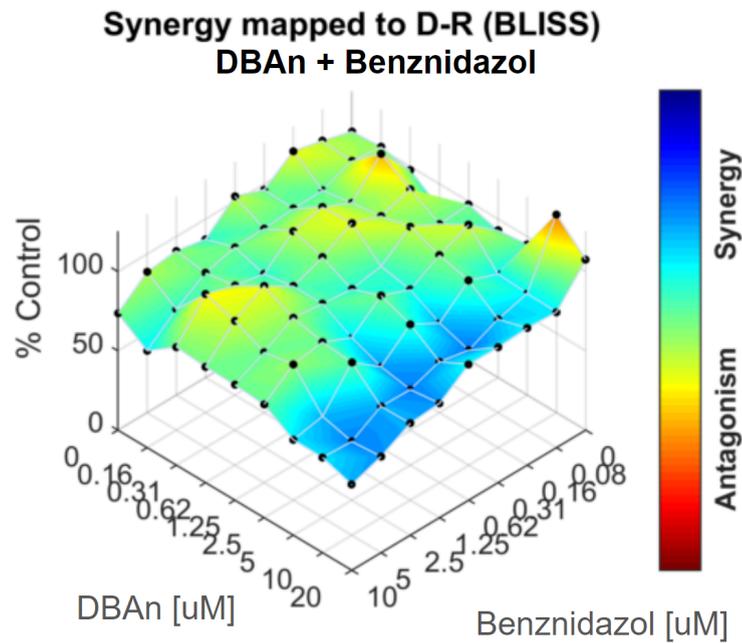
A combinação entre DBAn e Bz contra formas epimastigotas, é mostrada na figura 39. Observa-se a inibição do crescimento celular após 72h de tratamento, com a ocorrência de sinergismo entre as concentrações de DBAn (20 - 0,5 μM) e Bz (10 - 0,16 μM), destacada pela região azul escura com superfície mais profunda. As principais combinações que tiveram maiores pontuações positivas no gráfico matricial foram, em ordem decrescente: 10/0,31 μM ; 20/5 μM ; 10/0,62 μM ; 20/2,5 μM ; 10/2,5 μM ; 5/5 μM , nas concentrações de DBAn/Bz.

5.10.3 Avaliação da atividade sinérgica com DBAn + Bz em formas tripomastigotas

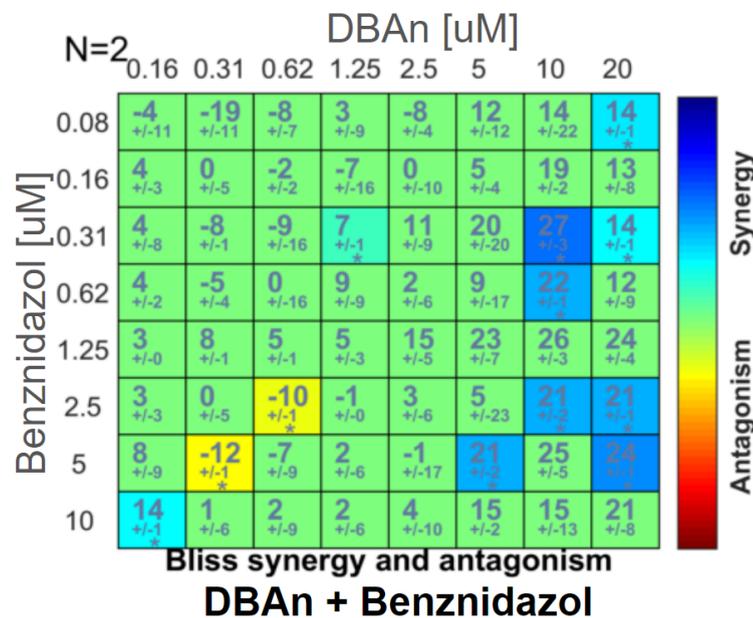
Após o resultado do sinergismo em formas epimastigotas, definiu-se as concentrações a serem utilizadas nas formas tripomastigotas. No gráfico de superfície, as combinações sinérgicas se concentraram entre (20 - 5,0 μM) DBAn e (10 e 5,0 μM) Bz. As melhores concentrações positivas na região de cor azul escuro, no gráfico matricial, foram em ordem decrescente: 10/10 μM ; 5/10 μM ; 10/5 μM ; 20/10 μM ; 20/5 μM , nas concentrações de DBAn/Bz (Fig. 40).

Figura 39 - Interações sinérgicas entre DBAn e Bz em formas epimastigotas.

A



B

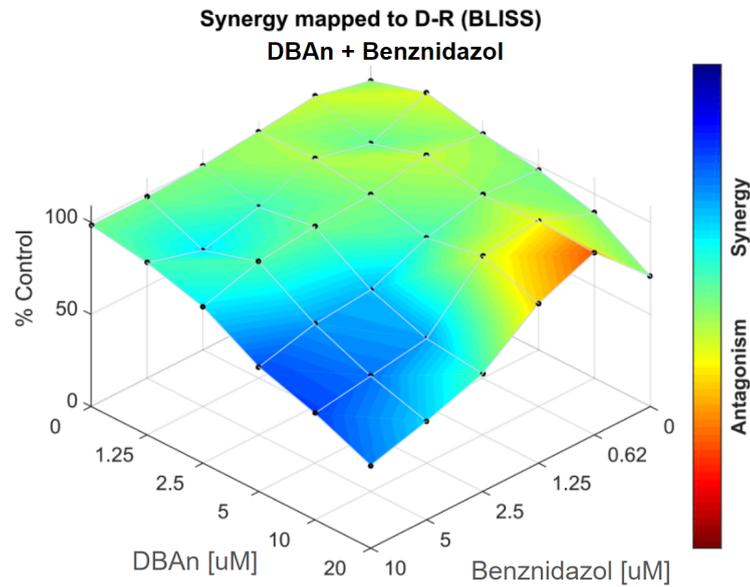


Fonte: Elaborado pelo autor.

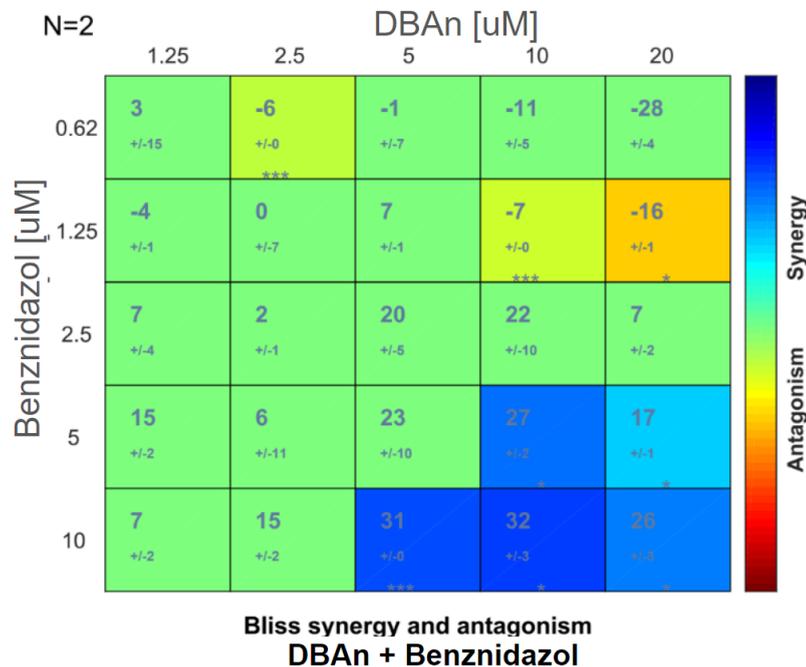
Legenda: (A) Análise de superfície dose-resposta, mostrando o mapeamento dos níveis de sinergia na combinação experimental entre DBAn e Bz; (B) Distribuição de sinergia, em formato matricial, derivada da combinação dose-resposta e da dose-resposta de referência, entre DBAn e Bz. nível de significância estatística: (*) para um valor de p menor que 0,05, (**) para um valor de p menor que 0,01 e (***) para um valor de p menos de 0,001. Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em duplicata. Análise obtida pelo software Combenefit utilizando o modelo de Bliss.

Figura 40 - Interações sinérgicas entre DBAn e Bz em formas tripomastigotas

A



B



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: (A) Análise de superfície dose-resposta, mostrando o mapeamento dos níveis de sinergia na combinação experimental entre DBAn e Bz; (B) Distribuição de sinergia, em formato matricial, derivada da combinação dose-resposta e da dose-resposta de referência, entre DBAn e Bz. nível de significância estatística: (*) para um valor de p menor que 0,05, (**) para um valor de p menor que 0,01 e (***) para um valor de p menos de 0,001. Os dados são expressos por média \pm erro padrão médio (E.P.M.) dos experimentos em duplicata. Análise obtida pelo software Combeneffit utilizando o modelo de Bliss.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A busca por novas moléculas tripanocidas é de extrema importância. A necessidade surge devido às limitações inerentes, que conta apenas com Bz como fármaco disponível, o qual apresenta eficácia limitada e efeitos adversos na fase crônica da DC, juntamente com perfil de toxicidade considerável (MILLS, 2020). Surge então a urgência de pesquisas de novos compostos antichagásicos. Diversas pesquisas se baseiam na procura de moléculas naturais e /ou sintéticas, direcionadas contra o *T. cruzi*, para o desenvolvimento de novas drogas que possuam alvos específicos/seletivos no metabolismo desse parasito (KRATZ, 2019).

Evidências mostram que a curcumina tem potenciais atividades antiparasitárias. No entanto, a absorção irregular, a instabilidade em pH ácido e a metabolização extensa dificultam seu uso, principalmente por via oral (GRESSLER *et al.*, 2015; CHERAGHIPOUR *et al.*, 2018; CAS; GHIDONI, 2019; CARAPINA DA SILVA *et al.*, 2019; RAI, 2020; ALBALAWI *et al.*, 2021). Assim, derivados sintéticos da curcumina, os curcuminóides, foram desenvolvidos para melhorar esses impasses farmacocinéticos e gerar compostos com maior atividade biológica e/ou menor toxicidade (ZHENG *et al.*, 2017; HOSSEINI-ZARE *et al.*, 2021).

Ademais, o presente trabalho demonstra, pela primeira vez, eventos de morte celular induzidos pelo curcuminóide sintético, (1E,4E)-1,5-bis-(4-metoxifenil)penta-1,4-dien-3-ona (DBAn), nas três formas de vida da cepa Y de *T. cruzi*. Além disso, simulações de acoplamento molecular foram realizadas com proteínas do metabolismo e virulência do parasito mostrando sua capacidade de interagir com estas enzimas.

Um dos problemas que surgiram em muitos países e que agravou a questão da morbimortalidade causada pela DC, é a existência de cepas resistentes, mesmo que parcialmente, ao tratamento atual (LIMA *et al.*, 2023). Particularmente a cepa Y apresenta uma maior resistência a medicamentos, pertencente ao grupo com genótipo TcII (FONSECA-BERZAL *et al.*, 2020). DBAn mostrou resultados interessantes contra a cepa Y do parasito parcialmente resistente ao Bz, destacando a relevância do trabalho e o potencial dos curcuminóides no desenvolvimento de novas substâncias tripanocidas.

Outros curcuminóides já demonstraram alta atividade contra as formas de vida dos parasitos: *L. major* e *T. gondii* (AL NASR *et al.*, 2021; KHAN *et al.*, 2021). *T. brucei* demonstrou ser suscetível aos curcuminóides fluorados, particularmente em cepas

multirresistentes (B48) (Changtam *et al.*, 2010). No estudo de Nagajyothi (2012), a própria molécula da curcumina foi capaz de impedir a infecção por *T. cruzi* em fibroblastos. Sueth-Santiago (2016) testou a curcumina e curcuminóides sintéticos, demonstrando efeitos relevantes contra as diferentes formas de vida do *T. cruzi*. Matiadis (2021) sintetizou e avaliou pirazolinias, derivadas de curcuminóides, comprovando que esses compostos são promissores na inibição do parasito.

Além disso, Saberi (2021) mostrou que derivados curcuminoides são mais potentes do que a curcumina contra a leishmaniose. Ainda, os curcuminóides apresentaram efeito antimicrobiano contra microrganismos como *Streptococcus sp.* (VIEIRA *et al.*, 2018), *Trichomonas vaginalis* (CARAPINA DA SILVA *et al.*, 2019) e espécies de *Candida sp.* (AZARI *et al.*, 2021; LEE *et al.*, 2022), reforçando o potencial biológico destes compostos.

Inicialmente, a determinação da citotoxicidade e das concentrações a serem utilizadas de DBAn nos ensaios de atividade antiparasitária foram feitas com células hospedeiras LLC-MK2, as quais são utilizadas para obtenção das formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares do *T. cruzi*. DBAn apresentou citotoxicidade inferior à do fármaco de referência, Bz. Enquanto a DBAn apresentou uma CC_{50} de 1277 μ M, Bz mostrou uma CC_{50} de 616 μ M.

A citotoxicidade dos curcuminóides já foi demonstrada em outras linhagens celulares, interferindo na inibição, proliferação e metástase em células cancerígenas: HNO97 ($CC_{50} = 35 \mu$ M) (ALMAKI *et al.*, 2021); HeLaS3, KBvin, MCF-7, HepG2, NCI-H460 e NCI-H460/MX2 ($CC_{50} < 40 \mu$ M) (CHEN *et al.*, 2021). Outro derivado curcuminóide demonstrou CC_{50} entre 27,7 e 73,4 μ M, em células cancerígenas de cólon (HCT116), mama (MCF-7) e nasofaríngeo (CNE2, 5-8F e 6-10B) (HE *et al.*, 2019). Estes resultados sugerem que os curcuminóides são altamente citotóxicos contra células cancerígenas, enquanto DBAn, poderia ser considerada uma molécula segura em células LLC-MK2, quando comparada com benznidazol. Após a medição da citotoxicidade para as células hospedeiras, foram realizadas experiências de atividade tripanocida.

As formas epimastigotas são encontradas no hospedeiro intermediário e apresentam baixa infectividade em humanos (De SOUSA; BARRIAS, 2020). Apesar disso, são as formas de vida mais resistentes do *T. cruzi*, sendo úteis em estudos de triagem tripanocida (BOLLINI *et al.*, 2019; DOMÍNGUEZ-DÍAZ *et al.*, 2021). Sueth-Santiago (2016) avaliaram o efeito natural de curcuminóides sintéticos em formas epimastigotas durante um período de tratamento de 7 dias, mostrando alterações importantes na membrana celular e no

citoesqueleto. Além disso, como são formas replicativas do *T. cruzi*, pode-se inferir que o DBAn interfere em processos celulares importantes para a sobrevivência e replicação do parasito, particularmente na diminuição celular e comprometimento do funcionamento do citoesqueleto do *T. cruzi*.

Destacamos o efeito do DBAn em forma tripomastigotas, onde doses em micromolar > 62,5 apresentaram resultados satisfatórios, eliminando todas as formas infecciosas do parasito em concentrações inferiores às de Bz, além de uma LC₅₀ de 35,46 µM, frente a uma LC₅₀ de 256 µM do Bz. Esse valor corrobora com Souza (2021), onde testou curcuminóides derivados da dibenzalacetona, entre elas uma molécula com a mesma estrutura que a molécula do nosso trabalho, apresentou uma LC₅₀ de 29,82 µM. Nesse mesmo trabalho, os testes foram limitados apenas ao estudo de citotoxicidade em células de mamíferos C2C12 e em formas tripomastigotas e amastigotas e teste de toxicidade aguda. Recentemente, derivados da dibenzalacetona foram testados contra *T. brucei*, vários desses análogos mostraram alta atividade tripanocida, com valores de LC₅₀ > 0,20 µM (FRANCISCO *et al.*, 2023).

Sueth-santiago (2016) demonstrou em seu trabalho que curcuminóides sintéticos foram capazes de inibir a liberação de tripomastigotas, em células de mamíferos previamente infectadas por 7 dias. O efeito do DBAn em formas tripomastigotas é de grande interesse, pois esta é a forma infectante do parasito encontrada em hospedeiros vertebrados. O efeito antiparasitário sobre estas formas é uma das mais importantes estratégias para prevenir e/ou retardar a infecção das células hospedeiras e a consequente diferenciação em amastigotas e na propagação da infecção, (PÉREZ-MAZLIAH; WARD; LEWIS, 2021).

O efeito biológico dos curcuminóides é atribuído ao grupo funcional cetona presente na cadeia principal do DBAn, pois a retirada deste grupo compromete o efeito tripanocida (CHAGTAM *et al.*, 2010; FRANCISCO *et al.*, 2023). Este efeito dos curcuminóides pode ser ainda potencializado pela adição de grupos -OCH₃ nas posições meta e para dos anéis aromáticos (SAKALYTE *et al.*, 2011; SOUZA *et al.*, 2021). Além disso, análogos e híbridos monoacetoados onde estes grupos estavam presentes, eram mais promissores contra cepas de *Leishmania donovani* e *T. brucei* (CHAGTAM *et al.*, 2010; CHAUHAN *et al.*, 2018; SINGH *et al.*, 2019).

A atividade tripanocida do DBAn também pode estar associada à presença de um Grupo receptor de Michael, capaz de interagir com macromoléculas através da adição de nucleófilos (doadores de Michael) para olefinas ativadas (aceitadores de Michael) (MATTOS; MAZORATI, 1999). No trabalho de Alkhaldi (2014), a atividade tripanocida de vários

curcuminóides monocetônicos foi relacionada à formação de adutos (ligações) entre a tripanotona redutase, uma enzima importante para o redox metabolismo do *T. brucei*, e a monoenona (receptor de Michael). Assim, esta ligação inativa a enzima, diminuindo os níveis de tiol essencial para a vida do parasito, comprometendo a homeostase do parasito e levando à morte celular (JIN *et al.*, 2007; FRANCISCO *et al.*, 2023).

A seletividade do DBAn apresentou uma IS de 36, resultado superior 15 vezes ao Bz, com IS de 2,4. Isto pode ser observado pela menor toxicidade nas células hospedeiras e maior aumento nas formas tripomastigotas. Uma $IS \geq 10$ é considerado como um ótimo critério para selecionar e avaliar a atividade biológica de uma molécula, tendo como parâmetro sua citotoxicidade (CARAPINA DA SILVA *et al.*, 2019). Destacamos nosso alto valor de IS da DBAn em comparação a outros estudos (CARAPINA DA SILVA *et al.*, 2019; SOUSA *et al.*, 2021), onde esse efeito poderia estar relacionado a grupos químicos presentes na sua estrutura. A presença de grupos metoxi pode estar relacionada a este efeito, de forma semelhante ao descrito por Sousa (2021), em derivados sintéticos da curcumina, os compostos com maior seletividade para *T. cruzi* foram aqueles com maior número desse grupo. Assim, o ótimo efeito da DBAn estaria relacionada a presença de dois grupamentos metóxi em sua molécula.

Nas formas intracelulares e replicativas do *T. cruzi*, o DBAn foi capaz de diminuir a quantidade de células infectadas, bem como o número de amastigotas em todas as concentrações testadas. Resultados semelhantes foram observados nos trabalhos de Aquele (2021) com *Leishmania sp.* e Sousa (2021) com curcumina e curcuminóides em faixas semelhantes de concentração e tempo de tratamento. O efeito anti amastigota do DBAn é de grande relevância, uma vez que essas formas replicativas do parasito são os principais envolvidos na propagação e avanço para o estágio crônico da DC (JIMENEZ-COELLO *et al.*, 2014; DUMOULIN; BURLEIGH, 2021).

Este efeito de diminuição da infecção em células LLC-MK2 pode estar relacionado à interferência do composto DBAn em mecanismos que envolvem ligação e/ou sinalização celular que permite a passagem do parasito através da membrana plasmática da célula hospedeira (CARADONNA; BURLEIGH, 2011). Esse efeito foi apresentado no estudo de Nagajyoyhi (2012), no qual o pré-tratamento com curcumina foi capaz de inibir a internalização do *T. cruzi* em fibroblastos, bloqueando a baixa densidade receptores de lipoproteínas (LDLr) nessas células, sendo essencial para a invasão pelo parasito.

Outros mecanismos a qual o DBAn poderia estar interferindo na infecção do *T. cruzi*, seria em estruturas essenciais para replicação ou sobrevivência do parasito, seja em vias metabólicas, impedindo a síntese e eliminação do aporte de nutrientes (CARADONNA; BURLEIGH, 2011; DUMOULIN; BURLEIGH, 2018; DUMOULIN; BURLEIGH, 2021), seja na perturbação no mecanismo do seu ciclo celular, com isso diminuindo sua replicação (DUMOULIN; BURLEIGH, 2018), ou até mesmo em processos que afetam a motilidade do curto flagelo retido em amastigotas (WON *et al.*, 2023). Essas hipóteses reforçam a capacidade do DBAn como um potencial agente terapêutico.

Os processos de oxidação ocorrem na mitocôndria, sendo necessário a presença de oxigênio para a produção de energia necessária ao parasito, com isso há produção de EROs. A interferência no mecanismo antioxidante, por exemplo em enzimas antioxidantes, favorece o aumento de EROs, e com isso pode ocorrer dano mitocondrial (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016).

Em nossos ensaios de citometria de fluxo, formas epimastigotas foram marcadas com DCFH₂-DA, um marcador de estresse oxidativo, assim nossos resultados demonstraram que o DBAn foi capaz de induzir a produção de EROs, evidenciando seu efeito tripanocida, ocasionando danos à membrana do *T. cruzi* após 24 h de tratamento. A ocorrência de estresse oxidativo é um dos eventos de maior e mais importante ocorrência, pois o desbalanço na produção e neutralização de ERO pode provocar peroxidação de lipídeos de membrana, danos ao material genético, autofagia e apoptose, afetando assim sistemas enzimáticos importantes para a sobrevivência do parasito (MACHADO-SILVA *et al.*, 2016; MESÍAS; GARG; ZAGO, 2019).

O aumento da produção de EROs pelo DBAn, pode ter sido ocasionado pela inibição do sistema de equilíbrio redox pelo nosso curcuminóide, conforme mostrado por Araveti e Srivastava (2019) para a curcumina em leucócitos bovinos infectados pelo protozoário *Theileria annulata*. Nesse estudo, a curcumina induziu a geração de EROs, culminando em autofagia e apoptose. Em células cancerígenas, Li (2015) propôs que os análogos da curcumina poderiam produzir uma grande quantidade de EROs através da intervenção do aceitador Michael em sistemas antioxidantes, ocasionando parada no ciclo celular. Além disso, Lazarin-Bidóia (2016) mostrou que moléculas dibenzilidenoacetona foram capazes de induzir estresse oxidativo nas três formas de vida do *T. cruzi*, com aumento de EROs, ocasionando danos na estrutura celular, peroxidação lipídica e fragmentação do DNA.

Um ambiente com altas concentrações de estresse oxidativo é capaz de causar danos ao *T. cruzi*, já em baixas concentrações pode ser essencial para a sinalização celular (MESÍAS; GARG; ZAGO, 2019). O próprio parasito possui diversos mecanismos de defesa antioxidante, como a enzima tripanotiona redutase (TcTR)(BOMBAÇA *et al.*, 2019). Estudos apontam que o Bz atue bloqueando essa enzima, inativando o mecanismo antioxidante do *T. cruzi* (TROCHINE *et al.*, 2014). Diante disso, como mostrado no ensaio do DCFH₂-DA, o DBAn poderia induzir a formação de EROs, pela inativação da TcTR.

Alterações no potencial de membrana mitocondrial servem como um parâmetro para avaliarmos dano mitocondrial. A Lesão mitocondrial pode formar canais porosos de alta condutância na mitocôndria, levando à perda do potencial de membrana e variações no pH celular. Assim, mudanças na fosforilação oxidativa e a produção de ATP podem levar à morte celular do parasito (KUMAR *et al.*, 2015). Por possuir apenas uma em seu citoplasma, a integridade da mitocôndria é essencial para a sobrevivência do *T. cruzi*, além de ser importante para seu metabolismo redox (MARTINS *et al.*, 2020).

DBAn foi capaz de reduzir o potencial de membrana mitocondrial do *T. cruzi*, evidenciado pelo acúmulo da Rho-123 no espaço intermembranar, uma vez que a Rho-123 se acumula apenas em mitocôndrias intactas (JOHNSON *et al.*, 1980), podendo ser observado pelo deslocamento na intensidade de fluorescência vermelha para esquerda no histograma. Essa despolarização é capaz de ocasionar um colapso no potencial de membrana mitocondrial do *T. cruzi*, conforme mostrado no trabalho de Galhardo (2022), onde formas tripomastigotas incubados com derivados de desidrodieugenol B, permaneceram sobre o efeito de despolarização mesmo após 2h de tratamento. Em outro estudo, dibenzilidenoacetona (mesmo grupamento presente em nossa molécula DBAn) indicaram despolarização mitocondrial nas três formas de vida do *T. cruzi*, em ensaio utilizando Rho-123 (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2016).

Embora os mecanismos envolvidos na morte celular em tripanossomatídeos ainda não totalmente elucidados, pode ser considerado um processo desregulado ou necrose incidental. No entanto, a perda de integridade nos tripanossomatídeos é característica de um perfil necrótico de morte celular (MENA-BARRETO, 2019), além da participação de metacaspases, endonuclease G, fator indutor de apoptose, cisteína proteases, serina proteases e sistemas antioxidantes (DAS, 2021).

Em nosso estudo, os eventos que levaram à morte celular do parasito foram avaliados por citometria de fluxo. A apoptose foi avaliada através de formas epimastigotas marcados

com anexina para avaliar a externalização da fosfatidilserina, um lipídio presente na membrana do parasito, durante o processo de apoptose esse lipídio se dirige para membrana externa (KUMAR *et al.*, 2015).

Para avaliação da necrose, os epimastigotas foram marcados com 7-AAD, que se liga a estruturas internas da célula uma vez que a membrana celular sofreu alguma lesão. Em nosso estudo o DBAn causou um aumento de fluorescência em parasitos marcados apenas com 7-AAD e parasitos marcados duplamente (7-AAD e anexina), observados após 24h de exposição, nas concentrações estudadas: 250 e 125 μ M. Esses resultados sugerem uma possível ativação de necrose celular induzida pelo DBAn, indicando a ocorrência de lesão na membrana do *T. cruzi*, tendo em vista que o 7-AAD não atravessa a membrana celular estando íntegra.

Uma das vantagens descritas da ocorrência de necrose em *T. cruzi* está no caráter irreversível desse tipo de evento celular, que impede a recuperação do parasito, sua proliferação e interfere na manutenção e evolução da doença (SOUSA *et al.*, 2021; ROCHA *et al.*, 2022; MAGALHÃES *et al.*, 2022). Outras moléculas foram capazes de desencadear eventos relacionados à necrose no *T. cruzi*, como a presença de bolhas na membrana do parasito e ativação de mecanismos de autofagia (DOS ANJOS *et al.*, 2016; SOUSA *et al.*, 2017; MOSQUILLO *et al.*, 2018). Além disso, dependendo do grau de dano à membrana plasmática, outras organelas podem ser danificadas, levando à morte celular irreversível (MENA-BARRETO, 2019).

No estudo de Elamin (2020), a curcumina foi capaz de induzir em 82,5 % a morte celular em promastigotas de *Leishmania major*. Em Adição, Singh; Chauhan (2018) demonstraram que uma dibenzalacetona curcuminóide foi capaz de interferir na expressão de genótipos relacionados à morte celular, apoptose e autofagia em formas amastigotas de *Leishmania donovani*.

Diante do exposto, seria possível afirmar que o DBAn induziu a formação de EROs, interferindo no sistema redox do *T. cruzi*, principalmente em enzimas antioxidantes. Este evento foi seguido pela despolarização do potencial de membrana mitocondrial, o que resultou em danos irreversíveis no parasito, como possíveis alterações na membrana plasmática, DNA e/ou em outras organelas. Com isso, interferindo em mecanismos necróticos/apoptóticos, levando à morte do parasito.

A abordagem molecular é de suma importância para a busca de novos alvos e a otimização de novas moléculas, além de informar quais parâmetros fornecem melhores resultados (KUMAR; ZHANG, 2016). Além disso, a triagem virtual auxilia na detecção de moléculas com alta afinidade de ligação com proteínas-alvo (FEINSTEIN; BRYLINSKI, 2015).

Buscando prováveis interações de DBAn com alvos moleculares de *T. cruzi*, foram realizadas simulações de docking molecular, com suas principais enzimas como gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), tripanotona redutase (TcTR) e cruzaina (TcCr). Inicialmente, pôde-se observar que o DBAn apresentava interações teóricas com todos os alvos, além de apresentar valores ótimos de energia de afinidade como também bons resultados de RMSD.

A TcGAPDH é uma enzima envolvida com a produção de energia no *T. cruzi*, além de funções na expressão gênica, manutenção da estrutura dos telômeros do parasito e manutenção dos níveis de NAD⁺/NADH no balanço energético e redox (PARIONA-LLANOS *et al.*, 2015; BELLUTI *et al.*, 2014). Os resíduos da enzima TcGAPDH, Arg249, Asp210, Cys166, His194, Ser165, Thr197, Thr226 e Tyr333 atuam como centro ativo do mecanismo catalítico da TcGADH (RODACKA, 2013).

Os resíduos de Glu44, Ala47 e Trp929 com os quais DBAn interagiu, apesar de não estarem localizados no sítio catalítico, estão em uma região próxima ao resíduo de Met 39, resíduo que na isoenzima de *Leishmania mexicana* está envolvido com a inibição da atividade da enzima por compostos presentes em frações do extrato de *Malachra alceifolia* Jacq. (CERVANTES-CEBALLOS *et al.*, 2023).

A TcCr é uma enzima que está envolvida com a infectividade do parasito, evasão de mecanismos imunológicos das células hospedeiras, bem como na diferenciação entre as formas de vida do parasito, e vem sendo apontada como a mais promissora na pesquisa por agentes tripanocidas, uma vez que sua inibição leva, rapidamente, a morte do parasito (RIVERA *et al.*, 2009; DOS SANTOS NASCIMENTO; DE AQUINO; DA SILVA-JÚNIOR, 2021; SCHARFSTEIN, 2018).

A cruzaina possui um sítio, conhecido por tríade catalítica formada pelos resíduos Asn 175, Cys 25, His 159 e dois resíduos com função importante na ligação de seus inibidores Gln 19 e Trp 177 (BRAK *et al.*, 2010). DBAn interagiu com uma região diferente do sítio catalítico de seu inibidor KB2. No entanto, resíduos de Gly e Leu presentes na TcCr, os quais

DBAn pode interagir, são apontados como relevantes para alterações conformacionais da TcCr (GILLMOR; CRAIK; FLETTERICK, 1997; BRAK *et al.*, 2010; BARBOSA DA SILVA *et al.*, 2019).

A enzima TcTR está envolvida com a sobrevivência do parasito contra a ação do estresse oxidativo que ocorre durante todo o seu ciclo de vida. Além disso, a produção de EROs é controlada pelo TcTR, uma vez que os níveis basais destas espécies devem ser mantidos para respostas celulares do parasito, como diferenciação, para funcionar de forma coordenada (PAULA *et al.*, 2020; PEDRA-REZENDE *et al.*, 2021; SARAIVA *et al.*, 2022).

A tripanotiona redutase possui duas subunidades, tendo dois sítios ativos. Sua funcionalidade é dependente de sua redução para a forma ativa, formando o sítio catalítico por Cys 53 e Cys 58 (VERA *et al.*, 2017). As simulações do complexo DBAn-TcTR mostrou interações com: Thr 536B, Ala 822B, Ser 663B, Asp 811B, Thr 891B, mesmo considerando que essa interação não ocorreu na mesma região que o inibidor QUM (Tyr 111B, Ile 339B, Ser 110B), observou-se que nossa molécula teve uma interação mais próxima do sítio de ação em uma das subunidades da Tripanotiona redutase do *T. cruzi*.

Com a TcTR, DBAn interagiu em uma região próxima ao sítio catalítico da subunidade B da enzima, podendo interferir no acoplamento do substrato tripanotiona dissulfeto T[S]₂ e sua conversão em T[SH]₂, ou de suas coenzimas FADH₂ e NADH (ALKHALDI *et al.*, 2014; MENDONÇA *et al.*, 2018). Essas interações acontecem por ligações de hidrogênio dos grupos metoxila e carbonila de DBAn. Além disso, existe a possibilidade do DBAn formar ligações com a TcTR, através do aceitador de Michael, reduzindo os níveis de tiol (ALKHALDI *et al.*, 2014; FRANCISCO *et al.*, 2023).

Entretanto, a inibição de TcTR ainda é pouco descrita para *T. cruzi*, quando comparada aos estudos com *Leishmania sp.*, em que moléculas bastante promissoras causam inibição desse alvo, intenso estresse oxidativo e consequente dano mitocondrial (PAULA *et al.*, 2020; INÁCIO *et al.*, 2021; PEDRA-REZENDE *et al.*, 2021; MAGALHÃES *et al.*, 2022). Esses achados, associados a disfunção mitocondrial e estresse oxidativo provocados por DBAn podem reforçar a hipótese de que a molécula interfere em processos cruciais para a homeostasia do parasito.

O estudo *in silico* das propriedades de novas moléculas pode diminuir os custos e otimizar o tempo necessário para o desenvolvimento dessas moléculas, o estudo ADMET de novas moléculas torna-se necessário principalmente para a predição de pesquisas futuras e

estudos *in vivo* (DAOUD *et al.*, 2021). Diante disso a molécula DBAn foi submetida a análise *in silico* de suas propriedades físico-químicas e ADMET.

Os ensaios preliminares demonstraram que a DBAn possui uma boa biodisponibilidade oral, por não violar nenhuma das regras de Lipinski (1997), assim como uma boa absorção intestinal superior ao Bz. Com isso, pode-se reforçar que a DBAn possui uma estabilidade adequada, o que possibilitaria sua administração por via oral. Outra explicação reside no fato de que a DBAn é uma monocetona, com uma melhor estabilidade e melhor absorção, enquanto que a molécula da curcumina é uma dicetona, sendo mais fácil sua degradação, resultando na sua instabilidade. Particularmente, essa estabilidade está associada à presença de ligantes aril cetona α,β -insaturados (LIANG *et al.*, 2009). Além disso, pesquisas anteriores mostraram que análogos da curcumina aumentaram suas características farmacocinéticas e farmacológicas com a modificação de sete para cinco carbonos na cadeia principal da molécula (LIANG *et al.*, 2009; ALKHALDI *et al.*, 2014).

O DBAn mostrou ser uma molécula lipossolúvel, o que permitiria atravessar mais facilmente a membrana do *T. cruzi*. Outros trabalhos demonstraram que uma maior lipofilicidade favorece o aumento do efeito antioxidante em moléculas análogas da curcumina (SHANG *et al.*, 2010; GIRST *et al.*, 2021).

Complementando os resultados dos parâmetros ADMET, mostramos que o DBAn não é capaz de causar hepatotoxicidade, em contraste com Bz, assim, para garantir a confiabilidade desse resultado seria relevante a dosagem das enzimas hepáticas em estudos *in vivo*.

Diversos estudos já demonstraram que a combinação de dois ou mais fármacos, ou associação de substâncias naturais com outras drogas, apresentaram um melhor efeito no tratamento de determinadas enfermidades. Essas combinações possuem como ponto principal a possibilidade de um efeito sinérgico. Conseqüentemente, a duração do tratamento e a toxicidade diminuiriam, assim como a necessidade de uma menor dosagem, contribuindo para uma melhor adesão do paciente (DE ALMEIDA *et al.*, 2021; AYDIN *et al.*, 2021; ARIEY-BONNET *et al.*, 2023; QIAN *et al.*, 2023; GAN *et al.*, 2023; ABUGRI *et al.*, 2023; HOSSEINI *et al.*, 2023).

Diante desse contexto, avaliamos as combinações de DBAn e Bz. Para isso, o sinergismo foi realizado através do modelo bliss. A escolha desse modelo deu-se como a melhor forma de avaliar os resultados dos efeitos dessas substâncias, tendo como critério suas

respostas independentes, visando vias separadas (TANG; WENNERBERG; AITTOKALLIO, 2015). A plataforma combenefit mapeou os resultados das combinações sinérgicas entre DBAn e Bz, em células LLC-MK2 e nas formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi*.

Em células LLC-MK2, a combinação de DBAn e Bz não ocorreu sinergismo nas doses testadas, como também foi possível observar a pouca variação na viabilidade celular, não ocorrendo citotoxicidade relevante. Esse é considerado um critério importante, uma vez que a busca de novas substâncias tem como objetivo não ser tóxico para células hospedeiras.

Nas combinações entre DBAn e Bz, obteve-se sinergismo em doses bem inferiores em relação à testagem dessas substâncias de forma isolada, nas três formas de vida do *T. cruzi*. O efeito combinado de DBAn e Bz, causou uma notável redução na viabilidade celular em formas epimastigotas com um melhor resultado na dose de 10/0,31 μM , de DBAn/Bz, respectivamente. Nas forma tripomastigotas obteve um melhor sinergismo na dose de 10/10 μM (DBAn/Bz).

Quando comparamos esses resultados do sinergismo com os experimentos realizados inicialmente em nosso estudo, podemos observar um aumento do efeito tripanocida, utilizando doses menores de DBAn. Por exemplo, nos experimentos isolados o efeito tripanocida nas formas epimastigotas e tripomastigotas mostraram resultados com doses $>62,5 \mu\text{M}$ de DBAn. No sinergismo, esse efeito foi obtido em doses $>10 \mu\text{M}$, ou seja, houve aumento potencializando o efeito tripanocida em 84% .

Nossos resultados de sinergismo corroboram com outros estudos, onde curcuminoides mostraram potente efeito sinérgico tripanocida. No estudo de Novaes (2016), a combinação da curcumina com Bz reduziu drasticamente a parasitemia em camundongos, com redução dos efeitos tóxicos do Bz. Uma outra molécula sintética derivada da curcumina A3K2A3, apresentou eficácia sinérgica quando combinada com Bz em tripomastigotas, ocasionando alterações morfológicas no *T. cruzi* (PERON *et al.*, 2017). Outros estudos mostraram potente efeito sinérgico da curcumina quando combinada com genisteína (ETTARI *et al.*, 2019); inibidor sintético da rhodesaína RK-52 (ETTARI *et al.*, 2020) e dipeptídeo nitrila CD34 (Di CHIO *et al.*, 2023), contra a enzima rhodesaína de *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Além disso, a curcumina combinada com agentes quimioterápicos mostrou sinergismo no tratamento de diversos tipos de cânceres, além de proporcionar uma melhor

concentração intracelular desses medicamentos (SHAH *et al.*, 2016; TAN; NORHAIZAN, 2019; BATRA; PAWAR; BAHL, 2019; WEI *et al.*, 2021).

Como já é bem descrito na literatura, o Bz é um fármaco com baixa tolerabilidade, sendo considerado uma molécula tóxica (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Além disso, estudos *in vivo* mostram que a baixa eficácia do Bz, deve-se ao fato de que essa molécula necessita ser metabolizada primeiramente para exercer seu efeito biológico (TROCHINE *et al.*, 2014).

Outros estudos também mostraram, em ensaios *in vitro*, que a combinação do Bz com outras substâncias, aumentaram a atividade tripanocida assim como atenuaram seus efeitos tóxicos (PUENTE *et al.*, 2018; STRAUSS *et al.*, 2018; DE ALMEIDA *et al.*, 2021; GULIN *et al.*, 2022; PIÑEIRO *et al.*, 2023). No estudo *in vivo* de Martins (2015), por exemplo, a administração de benznidazol/itraconazol em combinação eliminou os parasitos do sangue de forma mais eficiente do que cada medicamento isoladamente.

O efeito tripanocida observado no sinergismo de DBAn e Bz poderia estar relacionado ao mecanismo de ação no mesmo alvo ou em moléculas diferentes, resultando em mecanismo complementares, como observado no docking molecular do presente estudo, DBAn e Bz se ligaram em regiões alostéricas em enzimas específicas do *T. cruzi*. Outra possibilidade seria a combinação de mecanismos envolvido na geração de EROs, enquanto que o Bz induziria o estresse oxidativa no parasito (HALL E WILKINSON, 2012), o DBAn estaria potencializando a produção de EROs e/ou envolvido nos mecanismos de necrose/apoptose, como mostrado em nossos ensaios. Com isso, essa combinação de efeitos atuando em diferentes alvos, esgotariam os mecanismos de defesa, ocasionando a morte do *T. cruzi*.

Essa estratégia combinatória de DBAn e Bz no presente estudo, demonstrou um ótimo efeito inibitório contras todas as formas de vida do *T. cruzi*. Esses resultados sugerem a possibilidade futura da redução das doses utilizadas do Bz utilizadas em pacientes com DC. Além disso, haveria aumento da taxa de inibição contra o parasito, adicionado ao uso do DBAn, seja atuando de forma isolada ou potencializando o efeito do Bz. Diante dessa nova perspectiva de redução de doses necessárias para eliminar a infectividade do *T. cruzi*, haveria um menor risco de toxicidade.

CONCLUSÃO

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, DBAn apresentou efeito tripanocida em todas as formas de vida de *T. cruzi*, com maior efeito nas formas tripomastigotas. Visto que, apresentou um índice de seletividade 15 vezes superior ao Bz. Esse efeito está associado a indução de estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e dano na membrana plasmática. Além disso, esse efeito pode estar associado à interação com alvos enzimáticos primordiais para sobrevivência e proliferação do parasito.

A presença de grupos na molécula do DBAn como metoxil, cetona, e grupo aceitador de Michael podem contribuir para sua atividade antiparasitária e baixa toxicidade em células hospedeiras. Assim, esses dados podem explicar o efeito tripanocida da DBAn, além de fornecer perspectivas para um novo candidato a fármaco anti *T. cruzi*.

Ademais, nossos resultados dos ensaios do sinergismo mostraram-se promissores contra *T. cruzi*. Junto a possibilidade de se tornar uma nova abordagem terapêutica no tratamento de pacientes com DC, trazendo menos efeitos colaterais e menor risco de toxicidade. Estudos *in vivo* são necessários para avaliar melhor a eficácia dessa combinação entre DBAn e Bz.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUGRI, D. A. et al. Quercetin inhibits *Toxoplasma gondii* tachyzoite proliferation and acts synergically with azithromycin. **Parasites & Vectors**, v. 16, n. 1, p. 261, 3 ago. 2023.
- ADADE, CAMILA M.; CHAGAS, GABRIELA S. F.; SOUTO-PADRÓN, THAÏS. Apis mellifera venom induces different cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 139, n. 11, p. 1444-1461, 19 jul. 2012.
- ADADE, Camila M. *et al.* Crovirin, a Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) with Promising Activity against Trypanosomes and Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. e3252, 16 out. 2014.
- AL NASR, I. S. et al. p-Trifluoromethyl- and p-pentafluorothio-substituted curcuminoids of the 2,6-di[(E)-benzylidene]cycloalkanone type: Syntheses and activities against *Leishmania major* and *Toxoplasma gondii* parasites. **Bioorganic Chemistry**, v. 114, p. 105099, 1 set. 2021.
- ALARCÓN DE NOYA, B.; NOYA GONZÁLEZ, O. Orally Transmitted Chagas Disease: Biology, Epidemiology, and Clinical Aspects of a Foodborne Infection. **Birkhäuser advances in infectious diseases**, p. 225–241, 1 jan. 2019.
- ALBALAWI, A. E. et al. A Systematic Review of Curcumin and its Derivatives as Valuable Sources of Antileishmanial Agents. **Acta Parasitologica**, 26 mar. 2021.
- ALKHALDI, A. A. M. et al. Potent Trypanocidal Curcumin Analogs Bearing a Monoenone Linker Motif Act on *Trypanosoma brucei* by Forming an Adduct with Trypanothione. **Molecular Pharmacology**, v. 87, n. 3, p. 451–464, 19 dez. 2014.
- ALMALKI, Z. et al. In vitro cytotoxicity of curcuminoids against head and neck cancer HNO97 cell line. *Brazilian Journal of Biology*, v. 83, 2021.
- ALMEIDA-De FARIA, M.; FREYMÜLLER, E.; COLLI, W.; ALVES, M. J. M. *Trypanosoma cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote-like Form Exp. **Parasitology**, 92, 263–274, 1999.
- AHMED, T.; GILANI, A.H. Therapeutic potential of tumeric in Alzheimer's disease: curcumin or curcuminoids?. **Phytotherapy Research**, v.28, p.517-25, 2014.
- ANAND, Preetha *et al.* Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. **Molecular Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 807-818, 14 nov. 2007.
- ANDRADE, D.V.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Acute chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 8, n. 7, p.e3010, 2014.
- AQEELE, G. et al. Evaluation of curcumin and CM11 peptide alone and in combination against amastigote form of Iranian strain of *L. major* (MRHO/IR75/ER) in vitro. **Experimental parasitology**, v. 229, n. 108151, p. 108151, 2021.

ARANDA, Guillermo *et al.* Spawning Behaviour and Post-Spawning Migration Patterns of Atlantic Bluefin Tuna (*Thunnus thynnus*) Ascertained from Satellite Archival Tags. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. e76445, 1 out. 2013.

ARAVETI, P. B.; SRIVASTAVA, A. Curcumin induced oxidative stress causes autophagy and apoptosis in bovine leucocytes transformed by *Theileria annulata*. **Cell death discovery**, v. 5, n. 1, 2019.

AYDIN, D.; ÖZKAN, K.; AYDIN, A. The combination of amygdalin with some anticancer, antiparasitic, and antigout drugs against MG63, Saos2, SW1353, and FL cells *in vitro*. **Journal of medicinal food**, v. 24, n. jmf.2020.0143, 2021.

AZARI, B. *et al.* Antifungal activity of curcuminoids and difluorinated curcumin against clinical isolates of candida species. **Natural Products and Human Diseases**. Cham: Springer International Publishing, v. 1328p. 123–129, 2021.

BALOUZ, Virginia *et al.* Homologous Expression of Glycosylphosphatidylinositol-Anchored Glycoproteins in *Trypanosoma cruzi*. *In*: BALOUZ, Virginia *et al.* **Methods in Molecular Biology**. New York, NY: Springer New York, n.1955, p. 119-134, 2019.

BARBOSA DA SILVA, E. *et al.* Cruzain structures: apocruzain and cruzain bound to *S*-methyl thiomethanesulfonate and implications for drug design. **Acta crystallographica. Section F, Structural biology communications**, v. 75, n. 6, p. 419–427, 2019.

BASNET, P.; ŠKALKO-BASNET, N. Curcumin: an anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment. **Molecules**, v.16, p.4567-98, 2011.

BATRA, H.; PAWAR, S.; BAHL, D. Curcumin in combination with anti-cancer drugs: A nanomedicine review. **Pharmacological research: the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 139, p. 91–105, 2019.

BATTISTA, Theo *et al.* Targeting Trypanothione Reductase, a Key Enzyme in the Redox Trypanosomatid Metabolism, to Develop New Drugs against Leishmaniasis and Trypanosomiasis. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1924, 21 abr. 2020.

BELLUTI, F. *et al.* Toward the Development of Dual-Targeted Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase/Trypanothione Reductase Inhibitors against *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **ChemMedChem**, v. 9, n. 2, p. 371–382, 2014.

BELTRAN-HORTELANO, I.; PEREZ-SILANES, S.; GALIANO, S. Trypanothione Reductase and Superoxide Dismutase as Current Drug Targets for *Trypanosoma cruzi*: An Overview of Compounds with Activity against Chagas Disease. **Curr Med Chem**. v. 24, n. 11, p. 1066- 1138. 31 may 2017.

BELTRAN-HORTELANO, I. *et al.* Examination of multiple *Trypanosoma cruzi* targets in a new drug discovery approach for Chagas disease. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 58, n. 116577, p. 116577, 2022.

BERMUDEZ, José *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, abr. 2016.

BERN, Caryn. Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, 30 jul. 2015.

BOLLINI, M. et al. Synthesis, 2D-QSAR studies and biological evaluation of quinazoline derivatives as potent anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))**, v. 15, n. 3, p. 265–276, 2019.

BOMBAÇA, A. C. S. et al. Mitochondrial dysfunction and ROS production are essential for anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone-derived naphthoimidazoles. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, n. July 2018, p. 408–418, 2019.

BRAK, K. et al. Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy. **Journal of medicinal chemistry**, v. 53, n. 4, p. 1763–1773, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de Informação: Sangue e Hemoderivados. Produção Hemoterápica. Brasília, DF: 2011. Brasil. Ministério da Saúde. **Caderno de Informação: Sangue e Hemoderivados. Produção Hemoterápica**. Brasília, DF: 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Boletim Epidemiológico**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Número Especial. v.2. Abr. 2021. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/abril/14/boletim_especial_chagas_14abr21_b.pdf

BRENIÈRE, Simone Frédérique; WALECKX, Etienne; BARNABÉ, Christian. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 8, p. e0004792, 29 ago. 2016.

BRILHANTE, R. S. N. et al. Pentamidine inhibits the growth of *Sporothrix schenckii* complex and exhibits synergism with antifungal agents. **Future microbiology**, v. 13, n. 10, p. 1129–1140, 2018.

BRUNETO, E. G. et al. Case-fatality from orally-transmitted acute Chagas disease: A systematic review and meta-analysis. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 72, n. 6, p. 1084–1092, 2021.

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F.; HERREROS-CABELLO, A.; DEL MORAL-SALMORAL, J.; FRESNO, M.; GIRONÈS, N. The Complete Mitochondrial DNA of *Trypanosoma cruzi*: Maxicircles and Minicircles. **Front Cell Infect Microbiol**. Jun 29;11:672448. 2021.

CAMARGO, E. P. Growth And Differentiation In *Trypanosoma cruzi*. I. Origin Of Metacyclic Trypanosomes In Liquid Media. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 6, p. 93-100, may-jun, 1964.

CARADONNA, K. L.; BURLEIGH, B. A. Mechanisms of Host Cell Invasion by *Trypanosoma cruzi*. Em: WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B. (Eds.). **Advances in Parasitology**. San Diego, CA, USA: Elsevier, v. 76p. 33–61, 2011.

- CARAPINA DA SILVA, C. et al. Antiparasitic activity of synthetic curcumin monocarbonyl analogues against *Trichomonas vaginalis*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 111, p. 367–377, 1 mar. 2019.
- CARDILLO, Fabíola *et al.* Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, v. 73, n. 9, p. ftv082, 4 out. 2015.
- CARDOSO, Mariana S.; REIS-CUNHA, João Luís; BARTHOLOMEU, Daniella C. Evasion of the Immune Response by *Trypanosoma cruzi* during Acute Infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, p. 659, 18 jan. 2016.
- CAS M.D., GHIDONI R. Dietary curcumin: Correlation between bioavailability and health potential. **Nutrients**, v. 11, n. 9, p. 2147, 2019.
- CAVALCANTI, L.P.G., ROLIM, D.B., NETO, R.J.P., VILAR, D.C.L.F., NOGUEIRA, J.O.L., POMPEU, M.M.L. Microepidemia de doença de chagas aguda por transmissão oral no Ceará. **Cad Saúde Coletiva**. v. 17, p. 911-921, 2009.
- CEARÁ. **Boletim das Doenças Tropicais Negligenciadas**. Secretaria de Saúde, Governo do Estado do Ceará, 2021. Disponível em: https://www.saude.ce.gov.br/wp-content/uploads/sites/9/2018/06/BOLETIM_DOENCAS_NEGLIGENCIADAS_Revisado_Final_09042021.pdf
- CERVANTES-CEBALLOS, L. et al. Antileishmanial Activity and In Silico Molecular Docking Studies of *Malachra alceifolia* Jacq. Fractions against *Leishmania mexicana* Amastigotes. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 8, n. 2, p. 115, 2023.
- CHAN, L. L.-Y.; MCCULLEY, K. J.; KESSEL, S. L. Assessment of Cell Viability with Single-, Dual-, and Multi-Staining Methods Using Image Cytometry. **Methods in molecular biology** (Clifton, N.J.), v. 1601, p. 27–41, 2017.
- CHANGTAM, C. et al. Curcuminoid analogs with potent activity against *Trypanosoma* and *Leishmania* species. **European journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 3, p. 941–956, 2010.
- CHAUHAN, I. S. et al. Chemoprevention of Leishmaniasis: In - vitro antiparasitic activity of dibenzalacetone, a synthetic curcumin analog leads to apoptotic cell death in *Leishmania donovani*. **Parasitology international**, v. 67, n. 5, p. 627–636, 2018.
- CHEN, C.-Y. et al. Design, synthesis and evaluation of novel derivatives of curcuminoids with cytotoxicity. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 22, p. 12171, 2021.
- CHENG, Yang-Je *et al.* Improved Synthesis of Asymmetric Curcuminoids and Their Assessment as Antioxidants. **Molecules**, v. 27, n. 8, p. 2547, 14 abr. 2022.
- CHERAGHIPOUR, K. et al. Antiparasitic properties of curcumin: A review. **AIMS agriculture and food**, v. 4, n. 4, p. 1–18, 2018.

CHUIT, R. et al. Epidemiology of Chagas Disease. *In*: CHUIT, R. et al. **Chagas Disease**. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 91-109. ISBN 9783030000530. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-3-030-00054-7_4. Acesso em: 4 ago. 2022.

CLAYTON J. Chagas disease: pushing through the pipeline. **Nature**. v. 465, n. 7301, p. S12-S15. 24 jun 2010.

CONNERS, E. E. *et al.* A global systematic review of Chagas disease prevalence among migrants. **Acta Tropica**, v. 156, p. 68–78, 2016.

COURA, José Rodrigues. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, p. 549-554, jul. 2009.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 5-13, jul. 2010.

COURA, J. R.; VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. **Nature**, v. 465, n. S7301, p. S6-S7, jun. 2010.

COURA, J. R. Special issue on Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 275-276, maio 2015.

CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: **Molecule Applets for the World Wide Web**. 2019

DA SILVEIRA-LEMO, Denise *et al.* Phenotypic, functional and serological aspects of genotypic-specific immune response of experimental *T. cruzi* infection. **Acta Tropica**, v. 222, p. 106021, out. 2021.

DANTAS, Roberto Oliveira. Management of Esophageal Dysphagia in Chagas Disease. **Dysphagia**, v. 36, n. 3, p. 517-522, 14 abr. 2021.

DAOUD, Nour El-Huda *et al.* ADMET Profiling in Drug Discovery and Development: Perspectives of In Silico, In Vitro and Integrated Approaches. **Current Drug Metabolism**, v. 22, n. 7, p. 503-522, 14 set. 2021.

DAS, P.; SAHA, S.; BOSEDASGUPTA, S. The ultimate fate determinants of drug induced cell-death mechanisms in Trypanosomatids. **International journal for parasitology, drugs and drug resistance**, v. 15, p. 81–91, 2021.

DATTANI, A. *et al.*, Unraveling the antitrypanosomal mechanism of benznidazole and related 2-nitroimidazoles: From prodrug activation to DNA damage. **Mol Microbiol**. v. 116, n. 2, p. 674-689, 21 Aug 2021.

DE ALMEIDA, J. M. et al. Synergistic effect and ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi* caused by isoobtusilactone A in short exposure of time. **PloS one**, v. 16, n. 1, p. e0245882, 2021.

- DE MENEZES, Ramon R. P. P. B. *et al.* Antiparasitic effect of (–)- α -bisabolol against *Trypanosoma cruzi* Y strain forms. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 95, n. 3, p. 114860, nov. 2019.
- DE SOUZA, W.; BARRIAS, E. S. May the epimastigote form of *Trypanosoma cruzi* be infective? **Acta tropica**, v. 212, n. 105688, p. 105688, 2020.
- DI CHIO, C. *et al.* Dipeptide nitrile CD34 with curcumin: A new improved combination strategy to synergistically inhibit rhodesain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 10, 2023.
- DI VEROLI, G. Y. *et al.* Combenefit: an interactive platform for the analysis and visualization of drug combinations. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 32, n. 18, p. 2866–2868, 2016.
- DO CAMPO, Roberto; HUANG, Guozhong. The IP3 receptor and Ca²⁺ signaling in trypanosomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 4, p. 118947, jan. 2021.
- DOMÍNGUEZ-DÍAZ, L. R. *et al.* In vitro, ex vivo and in vivo short-term screening of DHEA nitrate derivatives activity over *Trypanosoma cruzi* Ninoa and TH strains from Oaxaca State, México. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 48, n. 116417, p. 116417, 2021.
- DOS ANJOS, D. O. *et al.* Effects of a novel β -lapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. **International journal for parasitology, drugs and drug resistance**, v. 6, n. 3, p. 207–219, 2016.
- DOS SANTOS NASCIMENTO, I. J.; DE AQUINO, T. M.; DA SILVA-JÚNIOR, E. F. Cruzain and rhodesain inhibitors: Last decade of advances in seeking for new compounds against American and African trypanosomiasis. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 21, n. 21, p. 1871–1899, 2021.
- DUMOULIN, P. C.; BURLEIGH, B. A. Stress-induced proliferation and cell cycle plasticity of intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **mBio**, v. 9, n. 4, 2018.
- DUMOULIN, P. C.; BURLEIGH, B. A. Metabolic flexibility in *Trypanosoma cruzi* amastigotes: implications for persistence and drug sensitivity. **Current opinion in microbiology**, v. 63, p. 244–249, 2021.
- ECHAVARRÍA, Natalia Giraldo *et al.* Chagas Disease: Chronic Chagas Cardiomyopathy. **Current Problems in Cardiology**, v. 46, n. 3, p. 100507, dez. 2019.
- ECHEVERRÍA, Luis Eduardo *et al.* WHF IASC Roadmap on Chagas Disease. **Global Heart**, v. 15, n. 1, p. 26, 30 mar. 2020.
- ELAMIN, M. *et al.* Anti-proliferative and apoptosis induction activities of curcumin on *Leishmania major*. **Revista Argentina de microbiología**, v. 53, n. 3, p. 240–247, 2021.
- ENGELS, Dirk; ZHOU, Xiao-Nong. Neglected tropical diseases: an effective global response to local poverty-related disease priorities. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 9, n. 1, 28 jan. 2020.

ETTARI, R. et al. Drug combination studies of curcumin and genistein against rhodesain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **Natural product research**, v. 33, n. 24, p. 3577–3581, 2019.

ETTARI, R. et al. Drug Synergism: Studies of Combination of RK-52 and Curcumin against Rhodensain of *Trypanosoma brucei rhodesiense*. **ACS medicinal chemistry letters**, v. 11, n. 5, p. 806–810, 2020.

FAROOQUI, Akhlaq A. Curcumin in Neurological Disorders. *In*: FAROOQUI, Akhlaq A. **Curcumin for Neurological and Psychiatric Disorders**. [S. l.]: Elsevier, p. 45-62, 2019.

FEINSTEIN, W. P.; BRYLINSKI, M. Calculating an optimal box size for ligand docking and virtual screening against experimental and predicted binding pockets. *Journal of cheminformatics*, v. 7, n. 1, p. 18, 2015.

FERREIRA, L. G.; ANDRICOPULO, A. D. Targeting cysteine proteases in trypanosomatid disease drug discovery. **Pharmacology & therapeutics**, v. 180, p. 49–61, 2017.

FILIGHEDDU, Maria Teresa; GÓRGOLAS, Miguel; RAMOS, José Manuel. Orally-transmitted Chagas disease. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 148, n. 3, p. 125-131, fev. 2017.

FLÁVIA NARDY, A.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; MORROT, A. Immune evasion strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of immunology research**, v. 2015, p. 178947, 2015.

FONSECA-BERZAL, C. et al. Activity profile of two 5-nitroindazole derivatives over the moderately drug-resistant *Trypanosoma cruzi* Y strain (DTU TcII): *in vitro* and *in vivo* studies. **Parasitology**, v. 147, n. 11, p. 1216–1228, 2020.

FRANCISCO, K. R. et al. Structure-activity relationship of dibenzylideneacetone analogs against the neglected disease pathogen, *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 81, n. 129123, p. 129123, 2023.

FRANCISCO, Amanda F. *et al.* Challenges in Chagas Disease Drug Development. **Molecules**, v. 25, n. 12, p. 2799, 17 jun. 2020.

FRANZÉN, O. *et al.* Shotgun Sequencing Analysis of *Trypanosoma cruzi* I Sylvio X10/1 and Comparison with *T. cruzi* VI CL Brener. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 3, p. e984, 2011.

FREITAS, R. F. *et al.* Discovery of novel *Trypanosoma cruzi* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2476-2482, 2009.

FUSAR-POLI, L. *et al.* Curcumin for depression: a meta-analysis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 60, n. 15, p. 2643-2653, 2019.

GAGANDEEP *et al.* Synthesis of novel monocarbonyl curcuminoids, evaluation of their efficacy against MRSA, including *ex vivo* infection model and their mechanistic studies. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 195, p. 112276, 2020.

GALHARDO, T. S. et al. New derivatives from dehydrodieugenol B and its methyl ether displayed high anti-Trypanosoma cruzi activity and cause depolarization of the plasma membrane and collapse the mitochondrial membrane potential. **Chemico-biological interactions**, v. 366, n. 110129, p. 110129, 2022.

GAN, Y. et al. Predicting synergistic anticancer drug combination based on low-rank global attention mechanism and bilinear predictor. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 39, n. 10, 2023.

GILLMOR, S. A.; CRAIK, C. S.; FLETTERICK, R. J. Structural determinants of specificity in the cysteine protease cruzain. **Protein science: a publication of the Protein Society**, v. 6, n. 8, p. 1603–1611, 1997.

GIRST, G. *et al.* Pharmacokinetics-Driven Evaluation of the Antioxidant Activity of Curcuminoids and Their Major Reduced Metabolites—A Medicinal Chemistry Approach. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3542, 2021.

GOMES, C. *et al.* American trypanosomiasis and Chagas disease: Sexual transmission. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 81, p. 81-84, abr. 2019.

GRESSLER, L. T. *et al.* Trypanocidal activity of free and nanoencapsulated curcumin on Trypanosoma evansi. **Parasitology**, v. 142, n. 3, p. 439-448, 19 ago. 2015.

GUIDETTO, B. *et al.* HIV and Chagas Disease Coinfection, a Tractable Disease? **Open Forum Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, 1, p. 307, jul. 2019.

GULIN, J. E. N. et al. Miltefosine and Benznidazole Combination Improve Anti-Trypanosoma cruzi In Vitro and In Vivo Efficacy. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, 2022.

GUTIERREZ, Brenda Celeste *et al.* Early Immune Response Elicited by Different Trypanosoma cruzi Infective Stages. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 25 nov. 2021.

HADDAD, Mohamed; SAUVAIN, Michel; DEHARO, Eric. Curcuma as a Parasitocidal Agent: A Review. **Planta Medica**, v. 77, n. 06, p. 672-678, 23 nov. 2010.

HALL, B. S.; WILKINSON, S. R. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 115–123, 2012.

HASSLOCHER-MORENO, A. M. *et al.* Indeterminate form of Chagas disease: historical, conceptual, clinical, and prognostic aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, p. e02542021, 2021.

HE, Y.-C. et al. Curcumin nicotinate selectively induces cancer cell apoptosis and cycle arrest through a P53-mediated mechanism. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 22, p. 4179, 2019.

- HERNÁNDEZ-CHINEA, C. *et al.* In vitro activity of synthetic tetrahydroindeno[2,1-c]quinolines on *Leishmania mexicana*. **Parasitology International**, v. 64, n. 6, p. 479-483, 2015.
- HERRERA-MAYORGA, V. *et al.* Structure-Based Virtual Screening and In Vitro Evaluation of New *Trypanosoma cruzi* Cruzain Inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 7, p. 1742, 2019.
- HEWLINGS, S.; KALMAN, D. Curcumin: A Review of Its Effects on Human Health. **Foods**, v. 6, n. 10, p. 92, 2017.
- HOSSEINI-ZARE, M. S. *et al.* Synergistic effects of curcumin and its analogs with other bioactive compounds: A comprehensive review. **European journal of medicinal chemistry**, v. 210, n. 113072, p. 113072, 2021.
- IMBERTY, A. *et al.* Molecular modelling of protein-carbohydrate interactions. Docking of monosaccharides in the binding site of concanavalin A. **Glycobiology**, v. 1, n. 6, p. 631–642, 1 dez. 1991.
- INACIO, J. D. F. *et al.* Epigallocatechin-O-3-gallate inhibits trypanothione reductase of *Leishmania infantum*, causing alterations in redox balance and leading to parasite death. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 11, p. 640561, 2021.
- JANSEN, A.M.; XAVIER, S. C. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 6 2018.
- JI, J.-L.; HUANG, X.-F.; ZHU, H.-L. Curcumin and its formulations: potential anti-cancer agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 12, n. 3, p. 210–218, 2012.
- JIMENEZ-COELLO, M. *et al.* In Vivo Antiprotozoal Activity of the Chloroform Extract from *Carica papaya* Seeds against Amastigote Stage of *Trypanosoma cruzi* during Indeterminate and Chronic Phase of Infection. **Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM**, v. 2014, p. 458263, 2014.
- JIN, F. *et al.* Structural requirements of 2',4',6'-tris(methoxymethoxy) chalcone derivatives for anti-inflammatory activity: the importance of a 2'-hydroxy moiety. **Archives of pharmacal research**, v. 30, n. 11, p. 1359–1367, 2007.
- JOHNSON, L.V.; WALSH, M.C.; CHEN, L.B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 77, n. 2, p. 990-994, 1980.
- JUNQUEIRA, A. C.; DEGRAVE, W.; BRANDAO, A. Minicircle organization and diversity in *Trypanosoma cruzi* populations. **Trends Parasitol**, England, v. 21, n. 6, p. 270-2, 2005.
- KADELA-TOMANEK, M. *et al.* Lipophilicity , Pharmacokinetic Properties , and Molecular Docking Study on SARS-CoV-2 Target for Betulin Triazole Derivatives with Attached 1 , 4-Quinone. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 781, 2021.

KESSLER, R. L. *et al.* Trypanosoma cruzi Response to Sterol Biosynthesis Inhibitors: Morphophysiological Alterations Leading to Cell Death. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. e55497, 2013.

KHAN, T. A. *et al.* Front Cover: Activity of Fluorinated Curcuminoids against Leishmania major and Toxoplasma gondii Parasites (Chem. Biodiversity 9/2021). **Chemistry & biodiversity**, v. 18, n. 9, 2021.

KHAN, M. A. *et al.* Assessment of antibacterial and antifungal potential of Curcuma longa and synthesized nanoparticles: A comparative study. **Journal of Basic Microbiology**, v. 61, n. 7, p. 603-611, 2021.

KIM, H. *et al.* A Quenched Annexin V-Fluorophore for the Real-Time Fluorescence Imaging of Apoptotic Processes In Vitro and In Vivo. **Advanced science (Weinheim, Baden-Wurttemberg, Germany)**, v. 7, n. 24, p. 2002988, 2020.

KLEIN, M. D. *et al.* Risk Factors for Maternal Chagas Disease and Vertical Transmission in a Bolivian Hospital. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 7, p. 2450 - 2456, 2020.

KOCAADAM, B; ŞANLIER, N. Curcumin, an active component of turmeric (Curcuma longa), and its effects on health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 13, p. 2889-2895, 2015.

KOTHA, R. R.; LUTHRIA, D. L. Curcumin: Biological, pharmaceutical, nutraceutical, and analytical aspects. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 16, p. 2930, 2019.

KRATZ, J. M. Drug discovery for chagas disease: A viewpoint. **Acta tropica**, v. 198, n. 105107, p. 105107, 2019.

KUMAR, G. *et al.* Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 85, p. 45–51, 2015.

KUMAR, A.; ZHANG, K. Y. J. Application of shape similarity in pose selection and virtual screening in CSARdock2014 exercise. **Journal of chemical information and modeling**, v. 56, n. 6, p. 965–973, 2016.

LAZARIN-BIDÓIA, D. *et al.* Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the Trypanosoma cruzi redox system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 890–903, 2016.

LEE, Y. S. *et al.* Curcumin affects function of Hsp90 and drug efflux pump of Candida albicans. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 12, p. 944611, 2022.

LEWIS, M. D. *et al.* Host and parasite genetics shape a link between Trypanosoma cruzi infection dynamics and chronic cardiomyopathy: ChronicT. cruzi infection dynamics and cardiomyopathy. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 10, p. 1429–1443, 2016.

LI, Y. et al. Hexamethoxylated monocarbonyl analogues of curcumin cause G2/M cell cycle arrest in NCI-H460 cells via Michael acceptor-dependent redox intervention. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 63, n. 35, p. 7731–7742, 2015.

LIANG, G *et al.* Exploration and synthesis of curcumin analogues with improved structural stability both in vitro and in vivo as cytotoxic agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 6, p. 2623-2631, 2009.

LIMA, D. A. et al. Transcriptomic analysis of benznidazole-resistant and susceptible *Trypanosoma cruzi* populations. **Parasites & vectors**, v. 16, n. 1, p. 167, 2023.

LIPINSKI, C. A. *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings 1PII of original article: S0169-409X(96)00423-1. The article was originally published in *Advanced Drug Delivery Reviews* 23 (1997) 3–25. 1. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 46, n. 1-3, p. 3-26, 2001.

LOPES, A. H. et al. Intracellular signaling pathways involved in cell differentiation in trypanosomatids. **The open parasitology journal**, v. 4, n. 1, p. 102–110, 2010.

LOSADA GALVÁN, I. et al. Benznidazole for the treatment of Chagas disease. **Expert Rev Anti Infect Ther.** v. 19, n. 5, p. 547-556, 2021.

LOSINNO, A. D. et al. Induction of autophagy increases the proteolytic activity of reservosomes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Autophagy**, v. 17, n. 2, p. 439–456, 2021.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012.

MACHADO-SILVA, A. et al. How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. **Mutation research. Reviews in mutation research**, v. 767, p. 8–22, 2016.

MAGALHÃES, E. P. et al. Chloride substitution on 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyphenylchalcones improves in vitro selectivity on *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Chemico-biological interactions**, v. 361, n. 109920, p. 109920, 2022.

MARINHO, E. M. et al. Virtual screening based on molecular docking of possible inhibitors of Covid-19 main protease. **Microbial pathogenesis**, v. 148, n. 104365, p. 104365, 2020.

MARINHO, M. M. et al. Quantum computational investigations and molecular docking studies on amentoflavone. **Heliyon**, v. 7, n. 1, p. e06079, 2021.

MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An updated view of the *Trypanosoma cruzi* life cycle: Intervention points for an effective treatment. **ACS infectious diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 2022.

- MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L. E.; NEPOMUCENO-MEJÍA, T. Nucleolar structure and function in trypanosomatid protozoa. **Cells (Basel, Switzerland)**, v. 8, n. 5, p. 421, 2019.
- MARTINS, T.A.F. et al. Benznidazole/itraconazole combination treatment enhances anti-Trypanosoma cruzi activity in experimental Chagas disease. **PloS one**, v. 10, n. 6, p. e0128707, 2015.
- MARTINS, M.A.S T. et al. Mitochondrial behavior during nuclear and mitochondrial DNA repair in Trypanosoma cruzi epimastigotes. **Experimental parasitology**, v. 219, n. 108016, p. 108016, 2020.
- MATIADIS, D. et al. Pyrazol(in)e derivatives of curcumin analogs as a new class of anti-Trypanosoma cruzi agents. **Future medicinal chemistry**, v. 13, n. 8, p. 701–714, 2021.
- MATTOS, M. C. DE; MARZORATI, L. Aspectos mecanísticos da adição de Michael. **Química nova**, v. 22, n. 5, p. 710–714, 1999.
- MATUTINO BASTOS, T. *et al.* Identification of Inhibitors to Trypanosoma cruzi Sirtuins Based on Compounds Developed to Human Enzymes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 10, p. 3659, 2020.
- MAYA, J. D. *et al.* Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.
- MEMARZIA, A. *et al.* Experimental and clinical reports on anti-inflammatory, antioxidant, and immunomodulatory effects of Curcuma longa and curcumin, an updated and comprehensive review. **BioFactors**, v. 47, n. 3, p. 311-350, 19 fev. 2021.
- MENDONÇA, A. A. S. et al. Relevance of Trypanothione Reductase Inhibitors on Trypanosoma cruzi Infection: A Systematic Review, Meta-Analysis, and In Silico Integrated Approach. **Oxid Med Cell Longev**. v. 2018, p. 8676578, 2018.
- MENEZES, R.R.P.P. Estudo dos efeitos do veneno da serpente Bothropoides insularis sobre células RAW 264.7 in vitro. 2013. 94f. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.** 2013.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill. **Cell death & disease**, v. 10, n. 2, 2019.
- MESÍAS, A. C.; GARG, N. J.; ZAGO, M. P. Redox balance keepers and possible cell functions managed by redox homeostasis in Trypanosoma cruzi. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 9, 2019.
- MILLS, R. M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 11, p. 1262-1265, 2020.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. **Bol Epidemiol**. 46(21):1-9, 2015.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. suppl 1, p. 181-184, set. 1999.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. **Journal of computational chemistry**, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.

MOSQUILLO, M. F. et al. *Trypanosoma cruzi* biochemical changes and cell death induced by an organometallic platinum-based compound. **Chemical biology & drug design**, v. 92, n. 3, p. 1657–1669, 2018.

NAGAJYOTHI, F. et al. Curcumin treatment provides protection against *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitology research**, v. 110, n. 6, p. 2491–2499, 2012.

NELSON, K. M. et al. The essential medicinal chemistry of curcumin: Miniperspective. **Journal of medicinal chemistry**, v. 60, n. 5, p. 1620–1637, 2017.

NGUYEN, D. D. et al. Rigidity strengthening: A mechanism for protein-ligand binding. **Journal of chemical information and modeling**, v. 57, n. 7, p. 1715–1721, 2017.

NIELEBOCK, M. A. P. et al. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. **PloS one**, v. 15, n. 12, p. e0243008, 2020.

NOVAES, R. D. et al. Curcumin enhances the anti-*Trypanosoma cruzi* activity of benzimidazole-based chemotherapy in acute experimental Chagas disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3355–3364, 2016.

OLIVERA, M. J. et al. Risk factors for treatment interruption and severe adverse effects to benzimidazole in adult patients with Chagas disease. **PloS one**, v. 12, n. 9, p. e0185033, 2017.

OLIVEIRA, M. M. et al. Spectroscopic characterization and efflux pump modulation of a thiophene curcumin derivative. **Journal of molecular structure**, v. 1215, n. 128291, p. 128291, 2020.

OMS. OMS. 2020. Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A road map for neglected tropical diseases 2021–2030 Overview. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>> Acesso em: 10 junho 2021.

OMS. OMS. Doença de Chagas (tripanossomíase americana). Fichas técnicas. 2022. Atualizado em abril de 2021]. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).

OMS. OMS Chagas disease (also known as American trypanosomiasis). World Health Organization, 6 abr. 2023. Disponível em:

[https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 20 agosto 2023.

PABON, H. J. J. A Synthesis of curcumin and related compounds. **Recueil**, v. 83, n. 4, p. 379-386, 1964.

PAHO. **WHO**. Chagas disease. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>, 2022. Acesso: 11 Jan. 2022.

PARIONA-LLANOS, R. et al. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase-telomere association correlates with redox status in *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 10, n. 3, p. e0120896, 2015.

PATIL, S. S.; BHASARKAR, S.; RATHOD, V. K. Extraction of curcuminoids from *Curcuma longa*: comparative study between batch extraction and novel three phase partitioning. **Preparative biochemistry & biotechnology**, v. 49, n. 4, p. 407–418, 2019.

PATRICK, G. L. Miscellaneous targets. *In*: PATRICK, Graham L. **Antimalarial Agents**. [S. l.]: Elsevier. p. 547-594, 2020

PAUCAR, R.; MORENO-VIGURI, E.; PÉREZ-SILANES, S. Challenges in Chagas Disease Drug Discovery: A Review. **Curr Med Chem**. v. 23, n. 28, p. 3154-3170, 2016.

PAULA, J. I. O. et al. New perspectives for hydrogen peroxide in the amastigogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1866, n. 12, p. 165951, 2020.

PAVÃO, F. et al. Structure of *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with chalepin, a natural product inhibitor, at 1.95 Å resolution. **FEBS letters**, v. 520, n. 1–3, p. 13–17, 2002.

PEDRA-REZENDE, Y. et al. Starvation and pH stress conditions induced mitochondrial dysfunction, ROS production and autophagy in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochimica et biophysica acta. Molecular basis of disease**, v. 1867, n. 2, p. 166028, 2021.

PEREIRA, M.G. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Are Able to Manage Internal Cholesterol Levels under Nutritional Lipid Stress Conditions. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. e0128949, 11 jun. 2015.

PÉREZ-MAZLIAH, D.; WARD, A. I.; LEWIS, M. D. Host-parasite dynamics in Chagas disease from systemic to hyper-local scales. **Parasite immunology**, v. 43, n. 2, p. e12786, 2021.

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

PÉREZ-MOLINA, J. A. et al. Trypanocidal treatment of Chagas disease. **Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed)**, v. 39, n. 9, p. 458–470, 2021.

- PERON, F. et al. Effects of (1E,4E)-2-Methyl-1,5-bis(4-nitrophenyl)penta-1,4-dien-3-one on *Trypanosoma cruzi* and Its Combinational Effect with Benznidazole, Ketoconazole, or Fluconazole. **BioMed research international**, v. 2017, p. 7254193, 2017.
- PIÑEIRO, M. et al. Antiparasitic activity of *Hippeastrum* species and synergistic interaction between montanine and benznidazole against *Trypanosoma cruzi*. **Microorganisms**, v. 11, n. 1, 2023.
- PINO-MARTÍNEZ, A. M. et al. IL-10 participates in the expansion and functional activation of CD8⁺ T cells during acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **Journal of leukocyte biology**, v. 105, n. 1, p. 163–175, 2019.
- PRASAD, S. *et al.* Curcumin, a component of golden spice: From bedside to bench and back. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 6, p. 1053-1064, nov. 2014.
- PRIYADARSINI, K. The Chemistry of Curcumin: From Extraction to Therapeutic Agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, 2014.
- PUENTE, V. et al. Anti-parasitic effect of vitamin C alone and in combination with benznidazole against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006764, 2018.
- QIAN, J. et al. Correction: Combination of micelles and liposomes as a promising drug delivery system: a review. **Drug delivery and translational research**, v. 13, n. 11, p. 2960, 2023.
- QUIÑONES, W. et al. Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 10, p. 25, 2020.
- RAI, M. et al. Curcumin and curcumin-loaded nanoparticles: antipathogenic and antiparasitic activities. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 18, n. 4, p. 367–379, 2020.
- RAJNEESH *et al.* Detection of Reactive Oxygen Species (ROS) in Cyanobacteria Using the Oxidant-sensing Probe 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate (DCFH-DA). **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 17, 2017.
- RAMÍREZ, J. C.; DA CRUZ MOREIRA, O. Assessing parasite load in Chagas disease patients by quantitative multiplex real-time PCR. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 1955, p. 215–225, 2019.
- RASSI, A. Jr; RASSI, A; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.
- RIVERA, G. *et al.* New Therapeutic Targets for Drug Design Against *Trypanosoma cruzi*, Advances and Perspectives. **Current Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 25, p. 3286-3293, 2009.
- ROCHA, Y. M. et al. Antiparasitary and antiproliferative activities in vitro of a 1,2,4-oxadiazole derivative on *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 121, n. 7, p. 2141–2156, 2022.

RODACKA, A. Properties and functional diversity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. **Postepy higieny i medycyny doświadczalnej**, v. 67, p. 775–789, 2013.

RODRIGUES, M. M.; OLIVEIRA, A. C.; BELLIO, M. The immune response to *Trypanosoma cruzi*: Role of Toll-like receptors and perspectives for vaccine development. **Journal of parasitology research**, v. 2012, p. 1–12, 2012.

SABERI, R. et al. A systematic literature review of curcumin with promising antileishmanial activity. **Infectious disorders drug targets**, v. 21, n. 3, p. 363–369, 2021.

SAKALYTE, A. et al. Effect of methoxy substituents on the properties of the derivatives of carbazole and diphenylamine. **The journal of physical chemistry. C, Nanomaterials and interfaces**, v. 115, n. 11, p. 4856–4862, 2011.

SÁNCHEZ-VEGA, J.T. et al. A case report of Chagas disease in acute phase diagnosed by xenodiagnosis. **Parasitology International**, v. 77, p. 102121, 2020.

SARAIVA, F. M. S. et al. Hypoxia effects on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes proliferation, differentiation, and energy metabolism. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 897, 2022.

SARAVANAMUTHU, A. et al. Two interacting binding sites for quinacrine derivatives in the active site of trypanothione reductase: A template for drug design. **The journal of biological chemistry**, v. 279, n. 28, p. 29493–29500, 2004.

SCHARFSTEIN, J. Subverting bradykinin-evoked inflammation by co-opting the contact system: Lessons from survival strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Current opinion in hematology**, v. 25, n. 5, p. 347–357, 2018.

SHAH, K. et al. Synergism of curcumin and cytarabine in the down regulation of multi-drug resistance genes in acute myeloid leukemia. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v. 16, n. 1, p. 128–135, 2015.

SHANG, Ya-Jing et al. Antioxidant capacity of curcumin-directed analogues: Structure–activity relationship and influence of microenvironment. **Food Chemistry**, v. 119, n. 4, p. 1435–1442, 2010.

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood–brain barrier choline transporter. **Advances and applications in bioinformatics and chemistry: AABC**, v. 7, p. 23–36, 2014.

SILVA, T. R. M. et al. Molecular characterization of *Trypanosoma cruzi* DTUs of the triatomine species in a Chagas disease endemic area. **Journal of parasitic diseases: official organ of the Indian Society for Parasitology**, v. 46, n. 1, p. 64–71, 2022.

SINGH, N.; CHAUHAN, I. S. MicroRNA expression profiling of dibenzalacetone (DBA) treated intracellular amastigotes of *Leishmania donovani*. **Experimental parasitology**, v. 193, p. 5–19, 2018.

SINGH, A. et al. Monocarbonyl curcumin-based molecular hybrids as potent antibacterial agents. **ACS omega**, v. 4, n. 7, p. 11673–11684, 2019.

SIQUEIRA-NETO, J. L. *et al.* Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 8, p. e0006512, 2018.

SOEIRO, M. N.; DE CASTRO, S. L. Trypanosoma cruzi targets for new chemotherapeutic approaches. **Expert Opin Ther Targets**. v. 13, n. 1, p. 105-121, 2009.

SOLEIMANI, V.; SAHEBKAR, A.; HOSSEINZADEH, H. Turmeric (Curcuma longa) and its major constituent (curcumin) as nontoxic and safe substances: Review. **Phytother Res**. v. 32, n. 6, p. 985-995, 2018.

SOUZA, W. de. Structural organization of Trypanosoma cruzi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 89-100, 2009.

SOUSA, P. L. et al. Betulinic acid induces cell death by necrosis in Trypanosoma cruzi. **Acta tropica**, v. 174, p. 72–75, 2017.

SOUZA, J.M. *et al.* In vitro anti-Trypanosoma cruzi activity enhancement of curcumin by its monoketone tetramethoxy analog diveratralacetone. **Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases**, v. 1, p. 100031, 2021.

STANIĆ, Z. Curcumin, a Compound from Natural Sources, a True Scientific Challenge – A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 72, n. 1, p. 1-12, 2016.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 317, 2014.

STRAUSS, M. et al. In vitro and in vivo drug combination for the treatment of Trypanosoma cruzi infection: A multivariate approach. **Experimental parasitology**, v. 189, p. 19–27, 2018.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumin, the golden powder from turmeric: Insights into chemical and biological activities. **Quimica nova**, 2015.

SUETH-SANTIAGO, V. et al. The effectiveness of natural diarylheptanoids against Trypanosoma cruzi: Cytotoxicity, ultrastructural alterations and molecular modeling studies. **PLoS one**, v. 11, n. 9, p. e0162926, 2016.

SULIMOV, V. B. et al. Docking paradigm in drug design. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 21, n. 6, p. 507–546, 2021.

TAN, B. L.; NORHAIZAN, M. E. Curcumin combination chemotherapy: The implication and efficacy in cancer. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 24, n. 14, p. 2527, 2019.

TANG, J.; WENNERBERG, K.; AITTOKALLIO, T. What is synergy? The Saariselkä agreement revisited. **Frontiers in pharmacology**, v. 6, 2015.

TEIXEIRA, D. E. *et al.* Interactive Multimedia to Teach the Life Cycle of Trypanosoma cruzi, the Causative Agent of Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 8, p. e1749, 2012

TROCHINE, A. et al. Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 5, p. e2844, 2014.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–461, 2010.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.

URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 55-68, 2010.

VÁZQUEZ, K. et al. Trypanothione Reductase: A Target for the Development of Anti-*Trypanosoma cruzi* Drugs. **Mini Rev Med Chem**. v. 17, n. 11, p. 939-946, 2017.

VELÁSQUEZ-ORTIZ, N.; RAMÍREZ, J. D. Understanding the oral transmission of *Trypanosoma cruzi* as a veterinary and medical foodborne zoonosis. **Research in veterinary science**, v. 132, p. 448–461, 2020.

VERA, B. et al. Structural analysis and molecular docking of trypanocidal aryloxy-quinones in trypanothione and glutathione reductases: a comparison with biochemical data. **Journal of biomolecular structure & dynamics**, v. 35, n. 8, p. 1785–1803, 2017.

VIEIRA, T. M. et al. Antimicrobial activity of monoketone curcuminoids against cariogenic bacteria. **Chemistry & biodiversity**, v. 15, n. 8, p. e1800216, 2018.

WANG, J.L.; SKOLNIK, S. Recent advances in physicochemical and ADMET profiling in drug discovery. **Chem. Biodiversity**, v.6, n.11, p.1887-1899, 2009.

WEI, M.-M. et al. A combination index and glycoproteomics-based approach revealed synergistic anticancer effects of curcuminoids of turmeric against prostate cancer PC3 cells. **Journal of ethnopharmacology**, v. 267, n. 113467, p. 113467, 2021.

WLODKOWIC, D. et al. Apoptosis and beyond: cytometry in studies of programmed cell death. **Methods in cell biology**, v. 103, p. 55–98, 2011.

WON, M. M. et al. The intracellular amastigote of *Trypanosoma cruzi* maintains an actively beating flagellum. **mBio**, v. 14, n. 2, p. e0355622, 2023.

YAN, J. et al. α -Glucosidase inhibition by luteolin: kinetics, interaction and molecular docking. **International journal of biological macromolecules**, v. 64, p. 213–223, 2014.

ZHAO, W. et al. A new Bliss independence model to analyze drug combination data. **Journal of biomolecular screening**, v. 19, n. 5, p. 817–821, 2014.

ZHENG, Q.-T. et al. Synthesis and antioxidant activity of curcumin analogs. **Journal of Asian natural products research**, v. 19, n. 5, p. 489–503, 2017.

ZINGALES, B. *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. **Acta Tropica**, v. 184, p. 38-52, 2018.

ZOROFCHIAN MOGHADAMTOUSI, S. *et al.* A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

ZUMA, A. A. Basic biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 27, n. 14, p. 1671–1732, 2021.