

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

LÍVIA BANDEIRA COSTA

**Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas, Candidatas a
Fármacos Leishmanicida e Tripanocida**

Recife
2015

LÍVIA BANDEIRA COSTA

**Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas, Candidatas a
Fármacos Leishmanicida e Tripanocida**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade
Federal de Pernambuco, para a obtenção do Título de
Doutora em Inovação Terapêutica

Orientadora: Prof (a). Dr^a. Ana Cristina Lima Leite
Coorientadora: Prof (a). Dr^a. Regina Célia B. Q. de Figueiredo
Coorientador: Dr. Marcos V. de Oliveira Cardoso

Recife

2015

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

Costa, Livia Bandeira

Avaliação farmacológica de novas hidrazonas, candidatas a fármacos de Leishmanicida e Tripanocida / Livia Bandeira Costa. – Recife: O Autor, 2015.
102 f.: il.

Orientadores: Ana Cristina Lima Leite, Regina Célia B. Q de Figueiredo, Marcos V. de Oliveira Cardoso

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2015.

Inclui referências e anexos

1. Leishmaniose 2. Doença de chagas 3. Farmacologia I. Leite, Ana Cristina Lima (orient.) II. Figueiredo, Regina Célia B. Q. de (coorient.) III. Cardoso, Marcos V. de Oliveira (coorient.) IV. Título.

616.936

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2016-321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: COSTA, Livia Bandeira

Título: Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas, Candidatas a Fármacos Leishmanicida e Tripanocida

Tese apresentada à Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutora em Inovação Terapêutica

Aprovada em: 21/08/2015

Banca Examinadora

Prof. Dr. Antonio Pereira das Neves Neto

Instituição: CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Assinatura: _____

Profa. Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Instituição: CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

Profa. Dra. Valéria Rêgo Alves Pereira

Instituição: CPqAM-FIOCRUZ

Assinatura: _____

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite

Instituição: Universidade Federal de Pernambuco- UFPE

Assinatura: _____

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Dr. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Maria Eduarda Lacerda de Larrazábal da Silva

VICE- DIRETOR(A) DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr^a. Oliane Maria Correia Magalhães

**COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta

**VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares

Dedico este trabalho à minha mãe por não
me deixar desistir e pelo amor
incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela oportunidade de viver novamente, pela proteção, por todas as conquistas e por ter colocado pessoas tão especiais em meu caminho.

À “Mainha”, a pessoa que mais acredita em mim e ao meu irmão João Wilson, por estar sempre presente, nos oferecendo todo o apoio necessário.

Aos meus familiares, especialmente às minhas queridas tias Roberta Regueira, Maria Bandeira e Augusta Sales por todo amor, apoio e cuidados.

Aos meus primos e amigos por todo carinho que existe entre nós.

Aos amigos Patrícia e Thyago por todo apoio, carinho e paciência durante os momentos difíceis.

Às amigas Edilene Pinto e Ana Canto por toda amizade e apoio na minha caminhada acadêmica.

À família Coelho por todo amor e incentivo.

Às amigas Juliana Cristine, Angele, Terezinha, Hayanna e Anabel pelo carinho e por todos os momentos de aprendizado que passamos juntas.

Aos amigos do curso de Biomedicina da UFPE, especialmente à: Veridiana, Renato, Luís, Steffany, Rafael, Maria Carolina, Julliana, Jana, Isabelle, Amanda, Alessandro, Cayo e Marek por serem motivo de orgulho e inspiração na minha vida, e por estarem sempre presentes. Amo vocês!

Às minhas orientadoras Ana Cristina e Regina Célia pela grande oportunidade, confiança, ensinamentos, apoio e compreensão. Muito obrigada pela contribuição na minha formação.

Ao meu coorientador Marcos Cardoso pelos ensinamentos, disponibilidade e atenção comigo e com nosso projeto.

Ao meu tutor da GlaxoSmithKline, Julio Martín por toda atenção durante o período em que estive na Espanha.

Aos colegas de laboratório por todos os momentos que passamos juntos e pela troca de conhecimentos a cada dia. Em especial, à Ana Carla e Andrezza que dedicaram seu tempo me auxiliando.

Às queridas amigas Taciana, Karla e Larissa por toda ajuda, estímulo, paciência e amizade. Vocês foram fundamentais para a construção deste trabalho. Muito obrigada, meninas!

Aos colegas do Laboratório de Planejamento em Química Medicinal/UFPE por sempre me receberem tão bem, principalmente a Paulo André pela indicação da nossa orientadora.

Ao Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ) por oferecer a estrutura para o desenvolvimento deste projeto e aos colegas, em especial a Gustavo, Maria Carolina, Viviane e Cássia que me auxiliaram em experimentos.

Aos colegas da GlaxoSmithKline por todos ensinamentos e atenção.

Aos pesquisadores e colegas do Laboratório de Biologia Celular e Molecular/CPqAM pelo apoio durante os experimentos.

Ao PPGIT pela oportunidade e ao secretário Paulo Germano por toda colaboração e paciência durante estes anos.

À professora Suely Galdino (*in memoriam*) pelo estímulo no início desta jornada.

Ao professor Pedro Rolim pela amizade e incentivo.

A professora Ana Beatriz Sotero pela oportunidade e apoio durante o estágio de docência.

Aos professores membros da banca de qualificação, Dr. Antonio Pereira, Dr^a. Sheilla Andrade e Dr^a. Maria Carolina Accioly, por todas as dicas e correções importantes.

A CAPES e ao CNPq pelo financiamento do projeto.

*“Sonho que se sonha só
É só um sonho que se sonha só
Mas sonho que se sonha junto é realidade!”
Raul Seixas*

RESUMO

COSTA, Livia Bandeira. Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas, Candidatas a Fármacos Leishmanicida e Tripanocida. Recife, 2015. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

As diversas formas de Leishmanioses e a doença de Chagas apresentam grande impacto na qualidade de vida dos indivíduos acometidos. Não existem vacinas para humanos disponíveis para essas enfermidades e as drogas utilizadas no tratamento apresentam efeitos adversos e eficácia limitada. Neste contexto, compostos orgânicos vêm sendo testados como alternativa terapêutica. Dentre esses, destacam-se as hidrazonas, moléculas que possuem ação antiparasitária entre outras atividades farmacológicas. A triagem de compostos, utilizando a metodologia atual de ensaios de alto rendimento (*High-throughput screening*-HTS), possibilita avaliar uma grande quantidade de moléculas candidatas com eficiência, baixo custo e confiabilidade. No presente trabalho, foram avaliadas as atividades leishmanicida, tripanocida e citotóxica de 50 hidrazonas (tiossemicarbazonas, tiazolinonas e tiazóis), através do método HTS. Os resultados demonstraram que 43 compostos não apresentaram citotoxicidade frente às células HepG2 (células de hepatoma humano). Entre esses, sete compostos apresentaram atividade leishmanicida no ensaio de infecção, além de serem inativos no teste de citotoxicidade em células THP-1 (linhagem celular da leucemia humana aguda monocítica). De acordo com os critérios de seletividade, o composto LpQM-15 foi o mais ativo contra *Leishmania sp.* sendo, por essa razão utilizado para estudos posteriores sobre os seus possíveis mecanismos de ação no parasito. A análise ultraestrutural da atividade desse composto em promastigotas de *Leishmania chagasi* foi realizada por microscopia eletrônica de transmissão. Com objetivo de analisar alterações morfofisiológicas causadas pelo LpQM-15, parasitos tratados e controles foram submetidos a marcação com Anexina V, Iodeto de Propídio e Rodamina 123, e analisados por microscopia confocal e citometria de fluxo. A análise ultraestrutural relevou aumento do volume da mitocôndria, perfis de membrana mitocondrial concêntricos, inchaço das cisternas do

complexo de Golgi e do retículo endoplasmático, ruptura da membrana celular, desorganização das organelas e a forte presença de inclusões lipídicas. O LpQM-15 foi capaz de induzir alterações no potencial de membrana mitocondrial. Além disso, os dados mostraram que este composto, nas concentrações testadas, induziu um mecanismo de morte celular sugestivo de apoptose nos parasitos. Das 43 moléculas não tóxicas frente às linhagens HepG2 e NIH-3T3 (fibroblastos), 12 apresentaram atividade tripanocida. Entretanto, três moléculas exibiram melhores resultados (LpQM-19, LpQM-28 e LpQM-31), corroborados através do modelo de relação quantitativa entre estrutura e atividade (QSAR). Adicionalmente, os compostos selecionados com atividade tripanocida não afetaram a viabilidade de células THP-1. Esses resultados sugerem que as moléculas bioativas frente à *Leishmania sp.* (LpQM-15) e ao *T. cruzi* (LpQM-19) são promissoras, apontando-as como candidatas a fármacos contra leishmaniose e doença de Chagas.

Palavras-chave: Leishmaniose. Doença de Chagas. Hidrazonas. HTS. QSAR.

ABSTRACT

COSTA, Livia Bandeira. Pharmacological Evaluation of New Hydrazones, Leishmanicidal and Trypanocidal Drugs Candidates. Recife, 2015. Thesis (PhD) – Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

The several forms of Leishmaniasis and the Chagas disease are illness that cause a great health impact to the life quality of infected individuals. No human vaccines are available for these diseases and the currently used therapy shows serious adverse effects and limited efficacy. Therefore, the development of new therapeutic strategies is needed. In this regard, several organic compounds have been tested as an alternative therapy. Among these compounds, the hydrazones have been recognized for having a potential antiparasitic activity. The screening of compounds using HTS (high-throughput screening) allows to evaluate a big set of molecules with efficiency, quickness, low costs, and reliability, in a standardized way. In the present work the leishmanicidal, trypanocidal and cytotoxic activities of 50 hydrazones (thiosemicarbazones, thiazolinones and thiazoles) were evaluated using HTS assay. Of the 50 compounds analyzed, 43 did not show cytotoxicity against HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line). Among these compounds, seven showed positive activity on the intramacrophage assay besides not presenting cytotoxicity against THP-1 (human monocytic leukemia cell line). According to the selectivity criteria, the LpQM-15 compound was the most effective against *Leishmania sp.*, and in this regard, it was used for further studies on its putative action mechanisms on this parasite. The ultrastructural analysis of *Leishmania chagasi* promastigotes treated with LpQM-15 revealed an increase in the mitochondrial volume, presence of concentric membranous profiles inside the mitochondrion, the swelling of the Golgi apparatus cisternae and endoplasmic reticulum, disruption of plasma membrane, cellular disorganization and the presence of a number of lipid inclusions. Aiming to evaluate the effects of LpQM-15 on the cell viability and mitochondrial membrane potential treated and untreated cells were submitted to annexin-V/propidium iodide and Rhodamin

123 labelling, respectively and analyzed by confocal microscopy and flow cytometry. LpQM-15 caused alterations in the mitochondrial membrane potential. Furthermore, our results suggest that LpQM-15, at tested concentrations, induced an apoptosis-like death in parasites. In Chapter 2, the trypanocidal and cytotoxic activities of compounds were evaluated. Of the 43 non-toxic compounds against HepG2 and NIH-3T3 (fibroblasts), 12 showed trypanocidal activity. The LpQM-19 LpQM-28 and LpQM-31 compounds showed to be the most effective against *T. cruzi*, being their trypanocidal activities corroborated by the quantitative structure-activity relationship model (QSAR). The most effective selected compounds against *Leishmania sp.* and *T. cruzi* showed no effect on the viability of THP-1. Taken together, our results point the LpQM-15 and LpQM-19 as drug candidates against leishmaniasis and Chagas disease, respectively.

Keywords: Leishmaniasis. Chagas Disease. Hydrazones. HTS. QSAR.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	28
Figura 2. Formas amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	29
Figura 3. Ciclo biológico da <i>Leishmania sp.</i>	31
Figura 4. Formas clínicas da leishmaniose cutânea	33
Figura 5. Paciente com leishmaniose visceral	36
Figura 6. Distribuição mundial dos casos de Doença de Chagas	45
Figura 7. Formas amastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	51
Figura 8. Formas tripomastigotas sanguíneas de <i>Trypanosoma cruzi</i> corados com Giemsa	52
Figura 9. Representação esquemática do ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	54
Figura 10. Estrutura química do nifurtimox e benznidazol	56
Figura 11. Ilustração da forma amastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> mostrando as principais estruturas celulares	61
Figura 12. Ilustração da forma promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i> mostrando as principais estruturas celulares	61
Figura 13. Coleção de compostos testados	82
Figura 14. Estrutura química do composto LpQM-15	89
Figura 15. Infecção de células THP-1 com <i>Leishmania donovani</i>	96
Figura 16. Efeito do LpQM-15 sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de <i>Leishmania chagasi</i> observado pela Microscopia Eletrônica de Transmissão	99

Figura 17. Efeitos do LPQM-15 no potencial de membrana mitocondrial de 102
promastigotas de *Leishmania chagasi*

Figura 18. Marcação da Anexina V/IP em formas promastigotas de 105
Leishmania chagasi tratadas com LPQM-15

Figura 19. Gráficos em *dot plots* das análises de citometria de fluxo de 106
formas promastigotas de *Leishmania chagasi* marcadas com Anexina V/IP

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Atividade citotóxica dos compostos em células de mamífero 94
e sobre a infecção de células THP-1 com *Leishmania donovani*
- Tabela 2.** Análise da citometria de fluxo de *Leishmania chagasi* tratada 103
com LpQM-15 e marcada com Rodamina 123
- Tabela 3.** Tiossemicarbazonas selecionados no ensaio intracelular em 110
Leishmania donovani

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
AV	Anexina-V
β -gal	β -galactosidase
BZN	Benznidazol
CAT	Cloranfenicol Acetil Transferase
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
DIC	Contraste de Interferência Diferencial
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido
DNDi	iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GFP	Proteína Verde Fluorescente
<i>eGFP</i>	Proteína Verde Fluorescente otimizada
<i>GSK</i>	<i>GlaxoSmithKline</i>
<i>HTS</i>	<i>High-throughput screening</i>
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento
IS	ndice de Seletividade
IV	ndice de Variação
IP	Iodeto de Propídio
kDNA	DNA mitocondrial
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LC	Leishmaniose Cutânea

LpQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
LV	Leishmaniose Visceral
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MSF	Médicos Sem Fronteiras
NFX	Nifurtimox
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pen-Estrep-Glut	Penicilina, estreptomicina e glutamina
pIC ₅₀	(-log [IC ₅₀])
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
QSAR	Relação Quantitativa entre Estrutura e Atividade
Rho 123	Rodamina 123
SFB	Soro Fetal Bovino
SMF	Sistema Mononuclear Fagocítico
TCC	Cruzaína do <i>Trypanosoma cruzi</i>
<i>T. cruzi</i> -β-gal	<i>T. cruzi</i> expressando β-galactosidase
TC ₅₀	Concentração capaz de causar 50% de toxicidade
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 JUSTIFICATIVA	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4 REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1 LEISHMANIOSES	25
4.1.1 Considerações gerais	25
4.1.2 Gênero <i>Leishmania</i>	28
4.1.3 Via de Transmissão e Ciclo Biológico	29
4.1.4 Formas clínicas das leishmanioses	32
4.1.4.1 <i>Leishmaniose cutânea</i>	32
4.1.4.2 <i>Leishmaniose visceral</i>	35
4.1.5 Diagnóstico	37
4.1.6 Tratamentos	38
4.2 DOENÇA DE CHAGAS	43
4.2.1 Considerações gerais	45
4.2.2 Vias de transmissão	45
4.2.3 Patologia da doença de Chagas	47
4.2.4 Morfologia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	50
4.2.4.1 <i>Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi</i>	52
4.2.5 Quimioterapia da doença de Chagas	55
4.3 BIOLOGIA CELULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS	60
4.3.1 Superfície Celular	62
4.3.2 Flagelo, Bolsa Flagelar e Citóstoma	63
4.3.3 Acidocalcisoma	64
4.3.4 Glicossomos	65
4.3.5 Megassomos	65
4.3.6 Mitocôndria e cinetoplasto	66
4.4 FERRAMENTAS E PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA A TRIAGEM DE DROGAS	67
4.4.1 Tecnologia de genes repórteres	67
4.4.2 Cultivo axênico de formas amastigotas do gênero <i>Leishmania</i>	69
4.4.3 Tecnologias para ensaios de alto rendimento	70
4.5 HIDRAZONAS: POTENTES AGENTES ANTIPARASITÁRIOS	75
Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas Candidatas a Fármacos Leishmanicida	
5 INTRODUÇÃO	81
6 MATERIAIS E MÉTODOS	82
6.1 COMPOSTOS	82

6.2 PARASITOS E LINHAGENS CELULARES	83
6.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE	84
6.4 ENSAIO INTRACELULAR DE ALTO RENDIMENTO COM FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA DONOVANI</i>	85
6.4.1 Critério de seleção dos compostos mais promissores contra <i>Leishmania donovani</i>	87
6.5 ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO COMPOSTO LPQM-15	88
6.5.1 Efeito <i>in vitro</i> do composto LpQM-15 frente à forma promastigota de <i>L. chagasi</i>	89
6.5.2 Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão	90
6.5.3 Análises por microscopia confocal e citometria de fluxo	90
6.5.3.1 <i>Anexina e Iodeto de Propídio</i>	90
6.5.3.2 <i>Rodamina 123</i>	91
7 RESULTADOS	92
7.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS	92
7.2 EFEITOS ULTRAESTRUTURAIS DO COMPOSTO LPQM-15 EM <i>L. CHAGASI</i>	97
7.3 EFEITO DO COMPOSTO LPQM-15 SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi$ M)	99
7.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR INDUZIDA PELO LPQM-15 SOBRE <i>LEISHMANIA CHAGASI</i>	103
8 DISCUSSÃO	108

Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas Candidatas a Fármacos Tripanocida

9 RESULTADOS	115
9.1 ARTIGO: COMPOUND PROFILING AND 3D-QSAR STUDIES OF HYDRAZONES DERIVATIVES WITH ACTIVITY AGAINST INTRACELLULAR <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> (SUBMETIDO À CHEMMEDCHEM EM 08/2015)	115
10 CONCLUSÕES	146
REFERÊNCIAS	147
APÊNDICES Artigo 2-Pyridyl thiazoles as novel anti <i>Trypanosoma cruzi</i> agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation	163
ANEXOS	176
ANEXO A Relatório GlaxoSmithKline	176
ANEXO B Resumo <i>ADD Program Symposium Challenge Exploration in Kinetoplastids Diseases: Assembling Three Anti-Leishmanial and Trypanosomal Boxes by High Throughput Screening of GSK Collection</i>	178

1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTN) são um grupo de enfermidades infecciosas comuns nas regiões tropicais e subtropicais. As pesquisas sobre DTNs tem aumentado em resposta à necessidade de se estabelecer sistemas de monitorização e melhorar os programas de tratamentos existentes, visando controlar os impactos dessas doenças (RIBEIRO et al, 2012; ARMAH et al, 2015).

A leishmaniose é uma das mais significantes DTN, acometendo cerca de 12 milhões de indivíduos, principalmente em países de baixa renda (ZANGGER et al, 2013). Não existem vacinas disponíveis para seres humanos e as drogas utilizadas para o tratamento (antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosine) apresentam inconvenientes, incluindo resistência dos parasitos aos tratamentos e alta toxicidade para os pacientes (SIQUEIRA-NETO et al, 2012).

Assim como a leishmaniose, a doença de Chagas faz parte do grupo de DTN e acomete cerca de 10 milhões de pessoas, sendo endêmica na América do Sul e América Central (MOREIRA et al, 2013). As drogas utilizadas para esta finalidade são o benznidazol e nifurtimox, as quais tem eficiência limitada na fase crônica da doença e apresentam significantes efeitos colaterais, além de serem contraindicados durante a gestação (HOTEZ et al, 2012b; MOREIRA et al, 2013).

Em resposta a esses problemas, a iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (*DNDi*) está acelerando as pesquisas para novas terapias para doença de Chagas e leishmaniose, objetivando o desenvolvimento de fármacos com baixa toxicidade, melhor tolerância pelos

pacientes, um tempo de tratamento mais curto e baixo custo (HOTEZ et al, 2012a; MOREIRA et al, 2013).

Na busca de novas moléculas contra DTN, causadas por parasitos, compostos sintéticos dos tipos hidrazonas, tiossemicarbazonas, semicarbazonas e tiazolinonas apresentam-se como promissores por possuírem atividades leishmanicida e tripanocida (BRITTA et al, 2010; BRITTA et al, 2014; MOREIRA et al, 2013; CARDOSO et al, 2014).

Estudos sobre atividades de hidrazonas em *T. cruzi* tem demonstrado que essas moléculas podem inibir a atividade de enzimas, tais como a cisteíno protease cruzaina, essenciais para a sobrevivência e proliferação do parasito (MCKERROW et al, 2006). Além disso, alguns desses compostos foram capazes de eliminar a infecção por *T. cruzi* em macrófagos e não apresentaram toxicidade frente à célula hospedeira (DU et al, 2002). Desta forma, o desenvolvimento dessas classes de agentes antiprotozoários, constitui um importante avanço nas pesquisas para doenças, como leishmaniose e doença de Chagas (HERNANDES et al, 2010; CARDOSO et al, 2014).

Diante desse contexto, a necessidade de identificação de novas moléculas tem impulsionado colaborações entre fundações e Universidades, buscando ferramentas atuais para a descoberta de fármacos eficazes e seguros (CHATELAIN, 2015). As metodologias utilizadas para o planejamento e seleção de substâncias bioativas têm sido focadas em alvos promissores, ensaios fenotípicos de alto rendimento (*High-throughput screening*-HTS) e triagem virtual (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011). A triagem de compostos, através do HTS, possibilita avaliar uma grande quantidade de moléculas com rapidez, eficiência e baixo custo. Adicionalmente, modelos de

preditivos de Relação Quantitativa entre Estrutura e Atividade (QSAR) facilitam o entendimento do mecanismo de ação de fármacos em nível molecular, podendo ser útil para o planejamento e o desenvolvimento de compostos (MARTINS; FERREIRA, 2013).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil farmacológico de compostos do tipo hidrazonas frente à *Leishmania sp.* e *T. cruzi*. Os resultados e discussões estão apresentados em dois capítulos. O primeiro capítulo é referente à triagem leishmanicida e citotóxica dos compostos, além de apresentar a investigação do mecanismo de ação da molécula mais bioativa. No segundo capítulo, a avaliação tripanocida dos compostos e o modelo QSAR desenvolvido estão apresentados no artigo submetido à ChemMedChem. No apêndice I está o primeiro artigo, publicado no periódico *European Journal of Medicinal Chemistry* (86: 48-59, 2014), que aponta a síntese e a avaliação farmacológica da série de tiazóis. Por fim, o anexo A e B traz o relatório final referente ao período de doutorado sanduíche, pelo programa Ciências sem Fronteiras, e um resumo publicado no *ADD Program Symposium* (Boston, EUA), respectivamente. Diante dos resultados demonstrados neste estudo, pretende-se dar seguimento às investigações dos alvos de atuação dos compostos promissores, oferecendo informações para futuros testes em modelos animais.

2 JUSTIFICATIVA

As quimioterapias existentes para leishmaniose e doença de Chagas é realizada com drogas que possuem eficácia questionável e diversos efeitos colaterais. Dentro deste contexto, novas moléculas vêm sendo testadas, visando encontrar medicamentos mais eficazes e seguros. Atualmente, a área de Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de fármacos tem investido no estudo de alvos terapêuticos, assim como no planejamento e na síntese de novos compostos.

As cisteíno proteases são enzimas que participam em importantes funções do ciclo de vida de muitos parasitos, como metabolismo e reprodução. Entre os tripanossomatídeos, essas enzimas são consideradas alvos atrativos e validados. Nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo moléculas anti-*T. cruzi*, utilizando a estrutura da cruzaina como alvo de estudo. Após testes de modificações moleculares, identificamos compostos orgânicos sintéticos, denominados tiazolinonas. Estes produtos apresentam propriedades tripanocidas equipotentes ao Benznidazol com a vantagem de serem pouco tóxicas para macrófagos humanos. Análogos estruturais das hidrazonas, tiossemicarbazonas, semicarbazonas e tiazolinonas vem sendo explorados por apresentarem comprovada atividade frente às cisteíno proteases dos parasitos, assim como uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo atividades antifúngicas, entre outras.

O desenvolvimento desses agentes antiprotozoários constitui um importante avanço nas pesquisas para as doenças negligenciadas. Ainda neste panorama, a seleção de ensaios mais relevantes constitui um grande desafio científico na área de P&D de fármacos. A triagem dos nossos compostos,

utilizando ferramentas atuais de triagem de alto rendimento (*High-throughput screening*-HTS), possibilitou avaliar *in vitro* uma grande quantidade de produtos, candidatos a fármacos contra leishmaniose e doença de Chagas, com rapidez, eficiência, baixo custo e confiabilidade. O impacto positivo do método HTS é observado através do número expressivo de estudos desenvolvidos nas últimas décadas. Adicionalmente, existe o interesse crescente dos laboratórios acadêmicos e indústrias farmacêuticas em elaborar essa técnica, uma vez que grande parte das moléculas considerada promissoras falham nos estudos de fase clínica. Dentro desse contexto, novos compostos bioativos precisam ser identificados para alcançarem com sucesso a fase de testes clínicos, evitando anos de estagnação em P&D na área de doenças negligenciadas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade farmacológica de novas séries de compostos pertencentes à classe química hidrazonas (tiossemicarbazonas, tiazolinonas e tiazóis) candidatos a fármacos com atividade leishmanicida e tripanocida.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Avaliar a citotoxicidade dos compostos hidrazonas;
- 3.2.2 Selecionar os compostos, através de triagem de alto rendimento frente a formas amastigotas de *Leishmania donovani* e *Trypanosoma cruzi*;
- 3.2.3 Avaliar os efeitos dos compostos selecionados sobre o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania chagasi*;
- 3.2.4 Identificar os possíveis alvos intracelulares de ação dos compostos selecionados em *Leishmania chagasi*;
- 3.2.5 Analisar possíveis efeitos dos compostos selecionados sobre a viabilidade e potencial de membrana mitocondrial de *Leishmania chagasi*.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 LEISHMANIOSES

4.1.1 Considerações Gerais

Depois da Malária e da Tripanossomíase Africana (doença do sono), a Leishmaniose é a terceira doença parasitária mais importante, estando em nono lugar em termos de carga global entre todas as doenças infecciosas e parasitárias (STOCKDALE & NEWTON, 2013). As leishmanioses são doenças endêmicas que ocorrem em várias partes do mundo, ocasionando um elevado índice de morbidade e mortalidade. Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários parasitos, pertencentes à família Trypanosomatidae e ao gênero *Leishmania*, possuindo um ciclo de vida que se alterna entre dois hospedeiros, no caso, um vertebrado e um inseto (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; MOREIRA et al, 2007; SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008; FALEIRO et al, 2014).

As leishmanioses assumem várias formas clínicas, podendo acometer a pele, as mucosas e as vísceras, dependendo da espécie de *Leishmania* e da resposta imune do hospedeiro (FIGUEIRAL, et al, 2008). Cerca de 18 espécies de leishmanias foram identificadas, de acordo com o tipo de lesão que ocasionam e de características moleculares (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). Oito principais espécies causam, pelo menos, três formas distintas da doença no homem: Leishmaniose Cutânea (LC) (*Leishmania tropica*; *Leishmania major*), Leishmaniose Mucocutânea (*Leishmania braziliensis*; *Leishmania mexicana*; *Leishmania amazonensis*) e Leishmaniose Visceral (LV) (*Leishmania (Leishmania) donovani*; *Leishmania (L.) infantum*; *Leishmania (L.)*

infantum chagasi) (BARRAL-NETO et al, 1998; HANDMAN, 2000; LAINSON e SHAW, 2005; SILVEIRA; CORBETT, 2010). As três espécies do parasito envolvidas com a infecção na leishmaniose visceral, dependem da região geográfica. A espécie *L. donovani* é encontrada na Índia, Ásia e África; *L. infantum* na Ásia, Europa e África; e *L. chagasi* nas Américas, onde a doença é denominada leishmaniose visceral americana ou calazar neotropical (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

As leishmanioses têm ampla distribuição na Ásia, África e América Latina. É endêmica em 98 países e atinge mais de 14 milhões de pessoas. Aproximadamente 58.000 casos de LV, 220.000 casos de LC e mais de 57.000 mortes são relatados anualmente. Além disso, a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam em risco de contrair leishmaniose (STOCKDALE & NEWTON, 2013).

A LV é uma doença potencialmente fatal com uma incidência estimada de 0,2 a 0,4 milhões de casos em todo o mundo, causando cerca de 20.000 a 40.000 mortes a cada ano (FALEIRO et al, 2014). A LV está presente em aproximadamente 70 países e em torno de 90% dos casos ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A região da África Oriental (Sudão, Sudão do Sul e Etiópia) é uma das mais afetadas com uma taxa de incidência anual estimada de 29.400 a 56.700 casos. Esses números podem ser subestimados devido à falta de relatos e diagnósticos errados (DIRO et al, 2014). Adicionalmente, dados oriundos de estudos epidemiológicos indicam que apenas 1 em 5-10 pessoas infectadas desenvolvem a leishmaniose visceral, sugerindo que o número de indivíduos infectados e,

consequentemente reservatórios de parasitos, é muito maior (DIRO et al, 2014; FALEIRO et al, 2014).

A LV afeta comunidades tipicamente pobres, residentes em lugares remotos e com sistemas de saneamento e saúde precários. Nesses lugares, o tratamento e os cuidados relacionados à LV são fornecidos e suportados por organizações internacionais como Médicos Sem Fronteiras (MSF), DNDi e OMS (DIRO et al, 2014). A importância da LV reside não somente na sua alta incidência e ampla distribuição, mas também na possibilidade de assumir formas graves e letais quando associada ao quadro de má nutrição e infecções concomitantes (GONTIJO e MELO, 2004).

No Brasil, existem sete espécies distintas do gênero *Leishmania* sendo que, destas, seis (*L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania lansoni*, *Leishmania shawii*, *Leishmania naiffi*) são responsáveis pela LC, e uma espécie (*L. chagasi*) é o principal agente etiológico da LV (MONTE NETO et al, 2011). A forma tegumentar, assim como a forma visceral, são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações (BEZERRA et al, 2006; MARTINS-MELO et al, 2014). Entretanto, com a urbanização crescente, essas doenças se disseminaram para todas as regiões do país, estando em crescente expansão em áreas não endêmicas (MARTINS-MELO et al, 2014; MARLOW et al, 2013). Atualmente, as leishmanioses estão distribuídas em 21 dos 27 estados do Brasil, com cerca de 3.500 casos anuais (MARTINS-MELO et al, 2014).

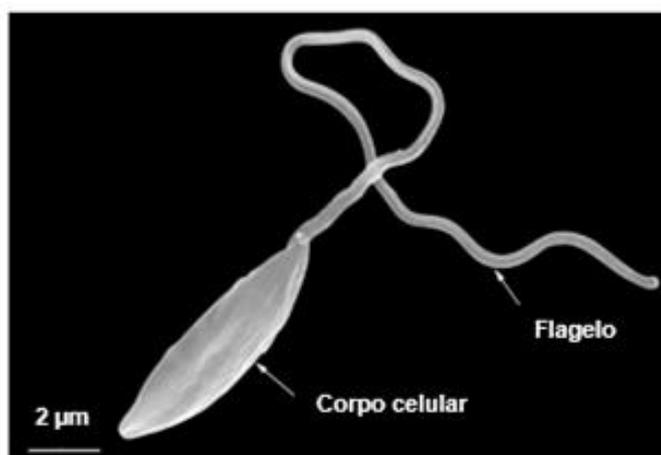
As diferentes formas clínicas da leishmaniose constituem um grave problema de saúde pública em vários países em desenvolvimento. Por serem

enfermidades associadas à pobreza, oferecem pouco incentivo comercial para as companhias farmacêuticas, retardando-se o desenvolvimento de medicamentos efetivos e baratos (BEZERRA et al, 2006; FIGUEIRAL et al, 2008).

4.1.2 Gênero *Leishmania*

Parasitas do gênero *Leishmania* possuem um ciclo de vida digenético com duas formas morfológica e fisiologicamente distintas: promastigota e amastigota. A forma promastigota é extracelular e é encontrada no trato digestivo dos hospedeiros invertebrados ou em meios de cultura apropriados. Os promastigotas apresentam morfologia fusiforme e com longo flagelo livre, medindo cerca de 15 micrômetros (**Figura 1**) (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008; FREITAS-JUNIOR et al, 2012).

Figura 1. Forma promastigota de *Leishmania amazonensis*

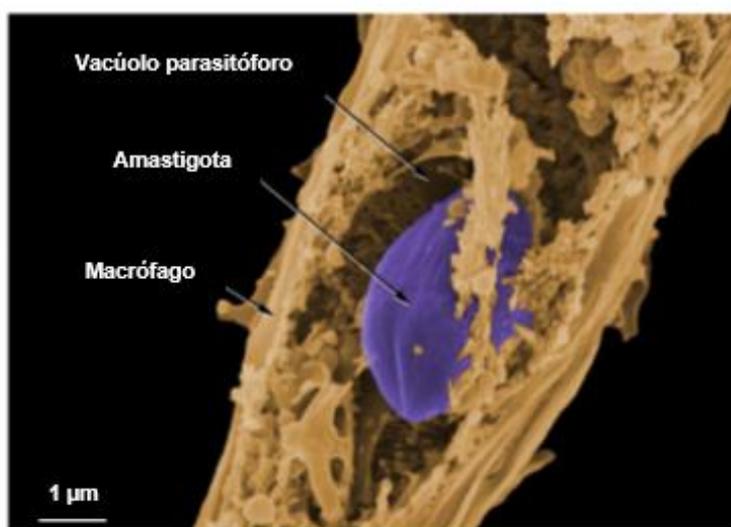


Fonte: Adaptado de Teixeira et al (2013)

Legenda: Micrografia da forma promastigota observada por microscopia eletrônica de varredura.

A forma amastigota é obrigatoriamente parasito intracelular em vertebrados, sendo encontrada nas células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), parasitando principalmente macrófagos. Este estágio evolutivo é arredondado ou oval, possuindo um curto flagelo que não se exterioriza, medindo de quatro a seis micrômetros de comprimento por dois micrômetros de diâmetro (**Figura 2**). Em ambas formas evolutivas, o ciclo de vida consiste em reprodução assexuada por divisão binária (NAKAMURA et al, 2006; SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

Figura 2. Formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*



Fonte: Adaptado de Teixeira et al (2013)

Legenda: Micrografia da forma amastigota dentro de um vacúolo parasitóforo no interior de um macrófago observada por microscopia eletrônica de varredura.

4.1.3 Via de Transmissão e Ciclo Biológico

As leishmanias são transmitidas entre os hospedeiros pela fêmea de mosquitos hematófagos pertencentes à subfamília *Phlebotominae* e ao gênero *Lutzomyia* (Américas e Oceania) e *Phlebotomus* (Europa, Ásia e África). Cerca de 30 espécies de flebotomíneos estão implicadas na transmissão de

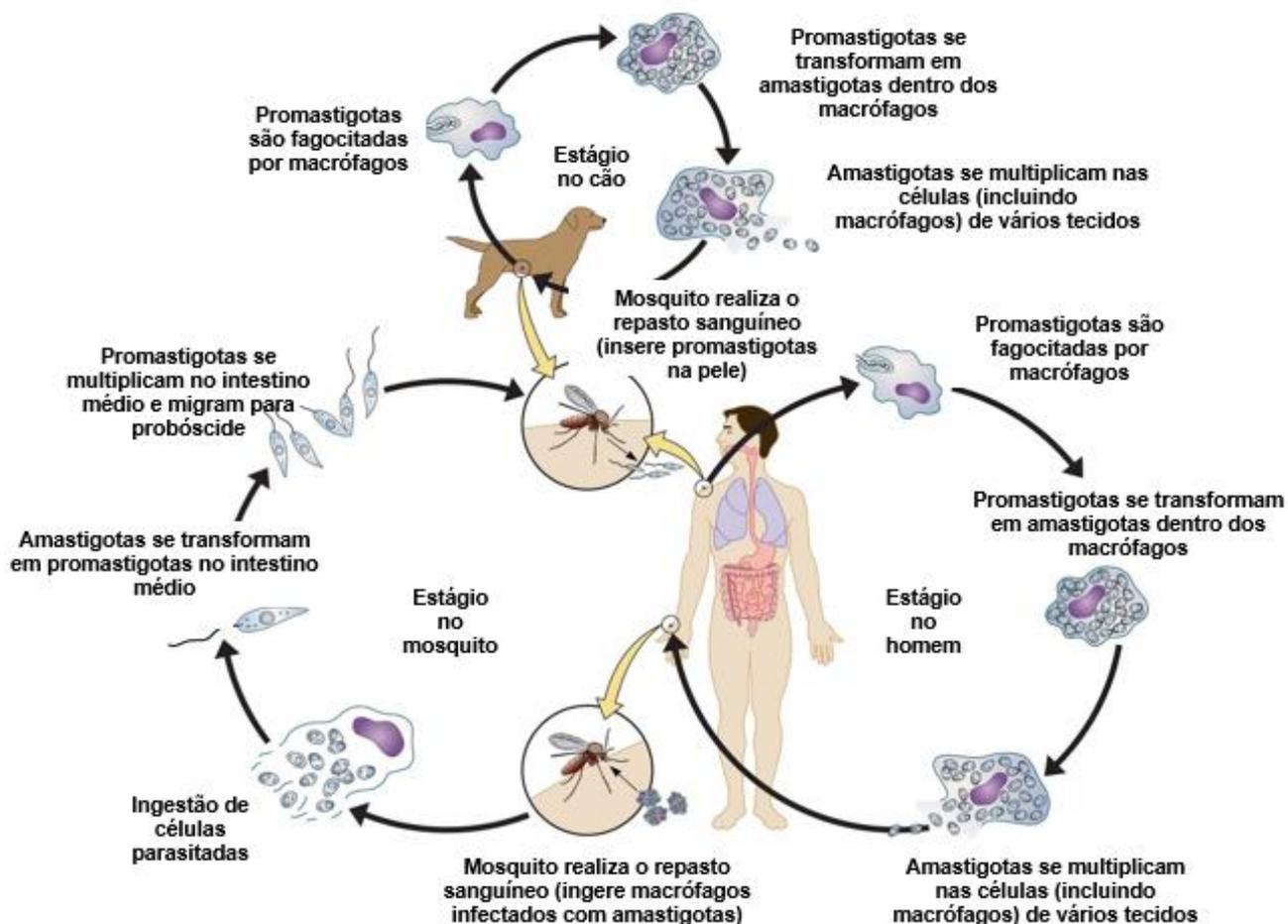
leishmanioses e são encontradas em torno de assentamentos humanos e matéria orgânica. Os hospedeiros primários são vertebrados, incluindo o homem, cães e gatos domésticos, gambás, raposas-do-mato e ratos. (STOCKDALE & NEWTON, 2013).

Ao picarem o homem ou animais infectados, os vetores ingerem macrófagos contendo formas amastigotas (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008; FALEIRO et al, 2014). No intestino médio do inseto, as leishmanias se transformam em flagelados pequenos, ovoides e pouco móveis, com alta taxa de multiplicação. Após alguns dias, surgem as formas promastigotas procíclicas, delgadas e longas, que se fixam nas vilosidades intestinais do inseto e estabelecem migração para as porções anteriores do tubo digestório, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicas (CAMARGO e BARCINSKI, 2003).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas ao picarem suas vítimas durante o repasto sanguíneo (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). Em seguida, são fagocitados por macrófagos, células dendríticas e/ou neutrófilos atraídos ao local da picada na pele. As promastigotas são internalizadas através de endocitose mediada por receptores na superfície das células do hospedeiro. Dentro do fagolisossomo, formas promastigotas se transformam em amastigotas que se multiplicam por divisão binária. Na ausência dos mecanismos de defesa da célula hospedeira, esta se rompe e as amastigotas liberadas serão internalizadas por outros macrófagos (FALEIRO et al, 2014). No hospedeiro mamífero, esses protozoários são parasitos intracelulares obrigatórios. Esse ciclo de vida complexo inclui várias facetas que devem ser

exploradas para o descobrimento de novas drogas (FREITAS-JUNIOR et al, 2012). O ciclo está demonstrado na figura 3.

Figura 3. Ciclo biológico da *Leishmania sp.*



Fonte: Adaptado de Esch e Petersen (2013)

O período de incubação da infecção vai desde a entrada do agente no organismo até o aparecimento dos sinais clínicos. Varia de 10 dias a 24 meses, sendo em média dois a quatro meses. O período de transmissibilidade ocorre enquanto persistir o parasitismo na pele ou no sangue circulante. Nos seres humanos, os parasitos se encontram principalmente no baço, medula óssea e fígado, devido à menor temperatura corpórea nesses órgãos. Além disso, o

indivíduo uma vez contaminado poderá ter recidivas em casos de queda de imunidade (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008).

Apesar de serem todas inoculadas na pele, espécies distintas de leishmanias têm preferências por órgãos diferentes, causam lesões maiores ou menores, produzem ou não metástases e podem ser ou não auto-curáveis. Além disso, induzem imunidade permanente ou temporária e às vezes nenhuma. Esses fatores e suas possíveis combinações são os responsáveis pelos diversos quadros clínicos das leishmanioses (CAMARGO e BARCINSKI, 2003).

4.1.4 Formas clínicas das leishmanioses

4.1.4.1 *Leishmaniose cutânea*

Aproximadamente 90% dos casos de LC ocorrem no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Iran, Brasil e Peru, estando relacionadas ao baixo nível socioeconômico (STOCKDALE & NEWTON, 2013). A LC apresenta um espectro de manifestações clínicas que variam de ulcerações simples na pele (forma cutânea localizada) (**Figura 4 A**) a vários graus de envolvimento da pele e mucosas (forma cutânea difusa, cutânea disseminada e mucocutânea) (**Figura 4 B, C, D**) (NAKAMURA et al, 2006; STOCKDALE & NEWTON, 2013).

Figura 4. Formas clínicas da leishmaniose cutânea

Fonte: Adaptado de Teixeira et al (2013)

Legenda: (A) Paciente com leishmaniose cutânea localizada. (B) Paciente com leishmaniose cutânea difusa (LCD). (C) Paciente com leishmaniose cutânea disseminada. (D) Paciente com leishmaniose mucocutânea.

A leishmaniose cutânea é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas confinadas na derme (geralmente úlceras profundas), principalmente nas áreas expostas do corpo, apresentando grande densidade de parasitos nos bordos das lesões nas fases iniciais, o que tende a reduzir nas úlceras crônicas. (CAMARGO e BARCINSKI, 2003). Essas úlceras permanecem ativas durante meses, expondo-se à colonização por microrganismos, componentes ou não da microbiota da pele (VERA et al, 2001). Existem poucos relatos sobre a prevalência de bactérias em úlceras leishmanióticas. Segundo estudos realizados no Brasil, Equador e Irã a bactéria mais prevalente nas úlceras leishmanióticas é o *Staphylococcus*

aureus. Em caso de sinais inflamatórios perilesionais além dos limites da úlcera, suspeita-se de infecção secundária. Dessa forma, estaria indicada além do tratamento para leishmaniose, a antibioticoterapia oral (VERA et al, 2006).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) ou forma anérgica é uma variação da forma cutânea que apresenta acentuada proliferação e generalizada disseminação do parasito. A doença começa com uma lesão única no local da picada do inseto vetor, sendo tratada de modo convencional, podendo desaparecer ao fim do primeiro tratamento. No entanto, em pacientes imunocomprometidos, surgem novas lesões difusas não ulceradas por toda a pele, contendo grande número de amastigotas. A doença apresenta evolução lenta e o tratamento não é eficaz, culminando com a formação de nódulos e placas de caráter altamente deformante com êxito invariavelmente letal (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; BRASIL, 2010).

No Brasil, principalmente na Amazônia, essa forma extremamente grave de leishmaniose é raríssima, sendo provocada pela *L. amazonensis*, manifestando-se em indivíduos com marcada deficiência imunológica (por exemplo, Síndrome da Imunodeficiência Adquirida-AIDS) (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; BRASIL, 2010).

A leishmaniose cutânea disseminada é uma forma relativamente rara da doença, podendo ser observada em cerca de 2% dos casos. É caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem várias partes do corpo. De acordo com o Ministério da Saúde, é causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A LCD não deve ser confundida com a LC disseminada, uma vez que esta ocorre em indivíduos

capazes de montar uma resposta imune celular contra o parasito, apresentando boa resposta à terapia (BRASIL, 2010).

Algumas formas tegumentares são bastante graves, como a leishmaniose mucocutânea que se diferencia da forma cutânea por produzir lesões destrutivas de mucosas e cartilagens, através de extensão direta da lesão primária ou através da disseminação hematogênica (BRASIL, 2010).

A mortalidade associada com LC não é significativa, entretanto a morbidade, na forma de lesões desfigurantes, com estigmatização social apresenta grande importância. Em áreas endêmicas, muitas pessoas acreditam que a LC é transmitida através do contato físico, resultando em restrição social. Os impactos negativos para a qualidade de vida e saúde mental dos indivíduos, resultantes do estigma social, são tão importantes quanto os efeitos socioeconômicos gerados pela doença (STOCKDALE & NEWTON, 2013).

4.1.4.2 *Leishmaniose visceral*

A LV é causada pela espécie *L. donovani* em humanos e *L. infantum* (*chagasi*) em ambos, seres humanos e cachorros (FALEIRO et al, 2014). É uma doença infecciosa sistêmica e de progressão crônica que tem como alvo o sistema retículoendotelial, também conhecido como Sistema Mononuclear Fagocítico (SMF). A apresentação clínica depende do tempo de evolução da doença, a partir da inoculação do parasito, e está sujeita a determinantes ainda não bem compreendidos. Alguns sintomas típicos são febre irregular de intensidade média e de longa duração, perda muscular, marcado emagrecimento, prostração, esplenomegalia e pancitopenia (MARZOCHI e MARZOCHI, 1994; SILVA et al, 2000; DIRO et al, 2014; FALEIRO et al, 2014).

As leishmanias, inoculadas na pele, atingem o SMF, chegando aos fagócitos do baço, fígado, nódulos linfáticos e medula óssea que são os órgãos comumente afetados. Esses parasitos podem ser disseminados e encontrados em locais periféricos, tais como a pele, intestinos, pulmões, sangue periférico, fluido peritoneal e glândulas. Ocorre hepatoesplenomegalia, caracterizada pelo aumento do abdome com baço e fígado palpáveis (**Figura 5**). É uma doença consumptiva e imunossupressora, acompanhada de sinais biológicos de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia, podendo haver linfadenopatia periférica. Hemorragia mucosa pode ocorrer como resultado da perda de protrombina e trombócitos (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; DIRO et al, 2014; FALEIRO et al, 2014).

Muitos pacientes podem se tornar severamente imunocomprometidos e podem estar sujeitos às infecções secundárias. O emagrecimento, o edema e o estado de debilidade progressiva contribuem para a caquexia e o óbito, se o paciente não for submetido ao tratamento específico (CAMARGO e BARCINSKI, 2003; FALEIRO et al, 2014).

Figura 5. Paciente com leishmaniose visceral



Fonte: Teixeira et al (2013)

Legenda: Note, marcado à tinta, o fígado e o baço com tamanho muito aumentado, representando o quadro de hepatoesplenomegalia.

Em regiões onde ocorre a transmissão de *L. donovani*, pacientes podem desenvolver uma erupção cutânea maculopapular ou nodular após o tratamento bem-sucedido para LV. Esta síndrome, chamada de leishmaniose dérmica pós-kala-azar (LDPK), se inicia em torno das áreas paranasais e perioral e se dissemina para o resto do corpo. No Sudão, LDPK é relatada em até 50% dos pacientes com LV tratados (DIRO et al, 2014).

4.1.5 Diagnóstico

O diagnóstico das leishmanioses é baseado em dados clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (GONTIJO e MELO, 2004; SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008). O padrão-ouro do diagnóstico dessas infecções é a visualização da forma amastigota do parasito, por microscopia, em esfregaços de tecidos, como aspirados esplênicos, medula óssea ou biópsia de fígado para LV e raspados ou fluidos de feridas cutâneas no caso de LC (STOCKDALE & NEWTON, 2013; FALEIRO et al, 2014).

O diagnóstico clínico da LV geralmente é confundido com outras doenças como malária, esquistossomose, tripanossomíase africana e tuberculose miliar, e para LC, com úlceras tropicais, lepra e câncer de pele. Adicionalmente, é importante ressaltar que nem sempre as infecções resultam em manifestações clínicas (STOCKDALE & NEWTON, 2013).

Atualmente, o diagnóstico das leishmanioses pode ser obtido através da demonstração de antígenos de *Leishmania* no tecido pela técnica da imunohistoquímica. Além disso, métodos sorológicos são cada vez mais utilizados para diagnosticar LV, mas não são adequados para LC. Além disso, esses métodos são limitados, pois não permitem a diferenciação entre

infecções passadas e presentes, uma vez que os anticorpos permanecem no soro por muitos anos mesmo após o tratamento bem-sucedido (STOCKDALE & NEWTON, 2013).

Nos últimos anos, o Ministério da Saúde tem investido em pesquisas sobre o diagnóstico laboratorial, tratamento dos pacientes, avaliação da efetividade das estratégias de controle, bem como de novas tecnologias que possam contribuir na melhoria das ações de vigilância e controle das leishmanioses no Brasil (MAIA-ELKHOURY, 2008).

4.1.6 Tratamentos

O tratamento de doenças causadas por protozoários é difícil, pois, por serem também eucariotos, compartilham muitas características com as células de mamíferos. Dessa forma, a atuação dos agentes antiparasitários ocorre em vias ou em alvos comuns ao parasito e ao hospedeiro (NAKAMURA et al, 2006).

Nos últimos sessenta anos, o tratamento das leishmanioses vem sendo realizado com a quimioterapia antimonial. Antimoniais pentavalentes, como Antimoniato-N-metil-glucamina- Glucantime® e o Estibogliconato de sódio- Pentostan®, são os medicamentos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil, segundo o Ministério da Saúde, e apresentam esquema terapêutico padronizado pela OMS (SANTOS, YOSHIOKA e MIYAGUI, 2008; SAMPAIO, LUCAS e COSTA-FILHO, 2009; ALVARENGA et al, 2010; FALEIRO et al, 2014). A dose recomendada é de 10-20 mg/kg/dia por um período de, no mínimo, 20 dias. Outros regimes podem ser adotados, não existindo um consenso sobre qual é o melhor. Além disso, a eficácia das

drogas varia com a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (OLIVEIRA et al, 2011).

Os compostos antimoniais se ligam a grupos sulfidrilas nas proteínas e podem formar tioantimonidas. Algumas evidências sugerem que a forma pentavalente pode ser reduzida *in vivo* ao antimonial trivalente antes de sua ligação. Os antimoniais trivalentes inibem a fosfofrutoquinase, uma enzima que limita a velocidade na glicólise. Esses fármacos afetam a estrutura celular, a função, a síntese ou a produção de energia. Os microrganismos, cujo crescimento depende do metabolismo anaeróbico da glicose, não podem sobreviver sem a presença da enzima ativa. Ainda não foi estabelecido se a inibição da fosfofrutoquinase é o mecanismo pelo qual os antimoniais pentavalentes inibem os protozoários (SCHEIBEL, 2005). Sabe-se ainda que essas drogas reforçam a atividade de macrófagos, o que contribui para a eliminação dos parasitos intracelulares (VANAERSCHOT et al, 2011).

Os antimoniais são irritantes para a mucosa intestinal e, por isso, são administrados por via intramuscular ou intravenosa. As concentrações sanguíneas máximas são obtidas em 2 horas. Esses fármacos ligam-se às células, incluindo aos eritrócitos, sendo encontrados em altas concentrações no fígado e no baço. Além disso, essas drogas ligam-se menos fortemente aos outros tecidos. Isso resulta em níveis sanguíneos mais elevados, excreção mais rápida e menor toxicidade. Embora a administração possa ser parenteral, a infiltração local na lesão da leishmaniose cutânea é eficaz (SCHEIBEL, 2005). O sucesso do tratamento deve ser comprovado seis semanas após ter sido concluído e os pacientes devem ser acompanhados durante seis meses (HEPBURN, 2000).

Os derivados antimoniais são ainda os compostos mais usados para o tratamento. Entretanto, essas drogas são tóxicas e não eliminam o parasito no organismo dos pacientes (TIUMAN et al, 2011). A redução da eficácia dos tratamentos ocorre, geralmente, devido à resistência aos medicamentos pelo parasito (CHAGAS et al, 2010; MONZOTE et al, 2010; TIUMAN et al, 2011; FALEIRO et al, 2014).

Nos últimos 15 anos, tem sido relatada a resistência generalizada aos antimoniais em diversas áreas, como na Índia e Nepal, onde ocorre metade dos casos de LV (TIUMAN et al, 2011). Ainda, estudos mostram que cepas resistentes aos antimoniais são mais virulentas em modelos *in vivo* do que cepas sensíveis. Entretanto, não se sabe exatamente qual é o mecanismo de resistência, podendo ser multifatorial (VANAERSCHOT et al, 2011).

Devido à alta toxicidade dos antimoniais, drogas secundárias, como a Anfotericina B e Pentamidina são opções na terapia combinada ou nos casos de contraindicação, intolerância e resistência/falha no tratamento (MONZOTE et al, 2010; OLIVEIRA et al, 2011). Devido à sua menor toxicidade, a Anfotericina B lipossomal (AmBisome®) é considerada a escolha de primeira linha para a leishmaniose visceral em lugar dos antimoniais e tem sido cada vez mais explorada na África Oriental (SCHEIBEL, 2005; DIRO et al, 2014). Nos últimos anos, alguns progressos foram feitos, como o uso de uma única dose de AmBisome® para tratar a leishmaniose visceral na Índia (FALEIRO et al, 2014). A anfotericina B é um antibiótico que atua em promastigotas e amastigotas, interagindo especificamente com o ergosterol, esteroide da membrana dos parasitos, causando aumento de permeabilidade, influxo de íons e morte do parasito (LINDOSO et al, 2012).

A Pentamidina é uma dibenzamidina se liga ao DNA de *Leishmania*, podendo inibir a replicação e função do DNA do cinetoplasto, e atua na membrana mitocondrial, levando à morte do parasito (LINDOSO et al, 2012). Seu efeito, em altas doses, pode atuar sobre a respiração dos microrganismos. Essa droga não é bem absorvida pelo trato intestinal após administração oral e, em geral, também é administrada por injeção intramuscular. A droga liga-se aos tecidos, particularmente no rim, e é lentamente excretada, em sua maior parte na forma inalterada (SCHEIBEL, 2005).

Nas leishmanioses essas drogas são usadas em esquemas prolongados, causando efeitos adversos como: alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas (GONTIJO e MELO, 2004; MOREIRA et al, 2007). O principal efeito colateral do Glucantime® é sua ação sobre o aparelho cardiovascular, sendo desaconselhável sua utilização entre pacientes com problemas cardíacos, renais e durante os dois primeiros trimestres de gravidez (GONTIJO e MELO, 2004).

A quimioterapia das leishmanioses está mais promissora com novos fármacos e formulações. Drogas como Miltefosina e Aminosidina (Paromomicina) foram desenvolvidas como tratamentos alternativos contra leishmaniose cutânea e visceral (FALEIRO et al, 2014).

Estudos clínicos têm identificado o Miltefosina, um medicamento originalmente desenvolvido como antineoplásico, como um eficaz agente anti-*Leishmania* (GONTIJO E MELO, 2004; SAMPAIO, LUCAS e COSTA-FILHO, 2009; MONZOTE et al, 2010;). Esta droga age, *in vitro* e *in vivo*, interferindo na biossíntese de fosfolipídios e esterol do parasito, sem interagir com o DNA, modulando a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana,

induzindo morte celular por apoptose (SAMPAIO, LUCAS e COSTA-FILHO, 2009; LINDOSO et al, 2012). A Miltefosina é bem tolerada, apresenta menor toxicidade e maior facilidade de administração por ser usada por via oral (GONTIJO E MELO, 2004; SAMPAIO, LUCAS e COSTA-FILHO, 2009; MONZOTE et al, 2010; LINDOSO et al, 2012). A limitação do seu uso está associada à toxicidade gastrointestinal, hepática e renal. Também é teratogênica, o que restringe seu uso por gestantes (TIUMAN et al, 2011; LINDOSO et al, 2012). Diante deste contexto, essas drogas não são consideradas ideais devido ao alto custo, toxicidade e desenvolvimento de resistência parasitária após uso prolongado (FALEIRO et al, 2014).

Existe claramente uma necessidade de drogas alternativas, mais eficazes e seguras, para tratar adequadamente os pacientes e parar o ciclo de infecção de *Leishmania* nos hospedeiros (STOCKDALE & NEWTON, 2013). Além disso, é importante destacar que uma droga efetiva e de uso oral contra leishmaniose aumentaria a adesão ao tratamento, pois essa doença é mais prevalente em lugares mais pobres e de difícil acesso, tais como municípios das Regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (SAMPAIO, LUCAS e COSTA-FILHO, 2009).

A ausência de uma vacina para humanos aumenta a necessidade de drogas efetivas para substituir ou suplementar aquelas de uso corrente (GIL et al, 2008). Em teoria, o desenvolvimento de uma vacina para prevenir a leishmaniose deve ser possível e tem sido uma meta de longo prazo para muitos pesquisadores (FALEIRO et al, 2014). Esse panorama de busca por novos agentes anti-*Leishmania* tem levado a um grande interesse no estudo de medicamentos tradicionais como origem de protótipos para o desenvolvimento

de novos compostos quimioterápicos com melhor atividade e menos efeitos colaterais (GIL et al, 2008). Pesquisadores em todo o mundo buscam por novas moléculas para o tratamento das leishmanioses, realizando triagens com compostos sintéticos e seus derivados.

4.2 DOENÇA DE CHAGAS

4.2.1 Considerações gerais

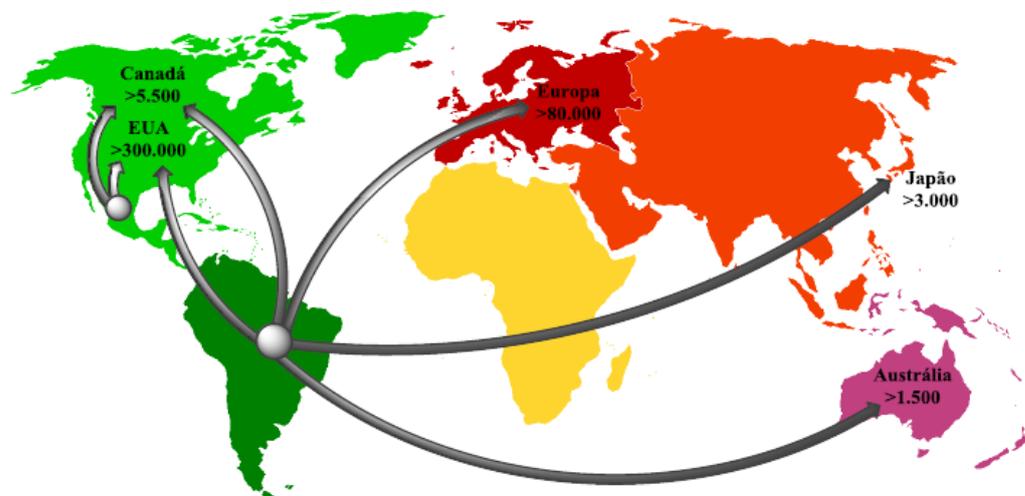
A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, foi caracterizada como uma enfermidade de populações pobres e rurais, mas a crescente urbanização, especialmente desde 1940, tem feito dessa doença um problema urbano de grande importância médica e social. Atualmente a doença de Chagas é reconhecida pela OMS como uma das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, e continua sendo um relevante problema socioeconômico na América Latina (AYO et al, 2013; RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

A doença de Chagas é causada pelo kinetoplastida *Trypanosoma cruzi* que foi descrito em 1909 pelo médico Carlos Chagas (1879–1934). A publicação original de Chagas é única na história da medicina, no sentido em que um único pesquisador descreveu em grandes detalhes o ciclo de transmissão (vetor, hospedeiro e um novo organismo infeccioso), as manifestações clínicas e caracterizou a síndrome como uma nova doença parasitária tropical (AYO et al, 2013; RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

No Hemisfério Ocidental, a doença de Chagas é responsável pelo maior índice de Anos de Vida Perdidos Ajustados por Incapacidade (DALY- *Disability Adjusted Life Years*- na sigla em inglês) entre as doenças negligenciadas. Esse

indicador mensura os anos de vida perdidos devido aos problemas de saúde, incapacidade ou morte precoce (SAMUELS et al, 2013). A OMS estima que aproximadamente 8-10 milhões de pessoas na América Latina estão infectadas com *T. cruzi*, onde a doença de Chagas é endêmica, e cerca de 80.000 e 300.000 na Europa (principalmente Espanha e Portugal) e Estados Unidos respectivamente, além de outras 100 milhões em risco de contrair a doença com uma incidência total estimada de 800 mil novos casos por ano (AYO et al, 2013; JACKSON et al, 2013; SAMUELS et al, 2013; WIGGERS et al, 2013; AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012).

Embora a doença de Chagas tenha sido localizada primeiramente na América Latina, a migração de países endêmicos tem levado ao surgimento dessa doença em regiões não endêmicas como Europa, Estados Unidos, Canadá, Japão e Austrália. O considerável influxo de imigrante nesses locais também tem feito da doença de Chagas um importante problema de saúde pública nesses países (**Figura 6**) (ANDRIANI et al, 2011; AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; SAMUELS et al, 2013; WIGGERS et al, 2013). A prevalência, incidência, e mortalidade associada à doença de Chagas mostram variações nas décadas recentes, principalmente devido ao impacto dos programas de controle, migração de populações rurais e urbanas, e mudanças socioeconômicas (AYO et al, 2013).

Figura 6. Distribuição mundial de casos de Doença de Chagas

Fonte: França et al (2014)

4.2.2 Vias de transmissão

A transmissão da doença de Chagas pode ser dividida em mecanismos primários e secundários: os principais mecanismos incluem a transmissão através de insetos vetores, por transfusão sanguínea, alimentos contaminados e a transmissão congênita. Formas secundárias de transmissão podem ocorrer em acidentes laboratoriais, transplantes de órgãos, feridas em contato com fluido menstrual ou esperma contaminado, e pela inoculação criminal (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; AYO et al, 2013).

A infecção vetorial é a forma mais frequente de transmissão da doença de Chagas (VIEIRA et al, 2012). O *T. cruzi* é naturalmente disseminado por insetos hematófagos da subfamília Triatominae (Hemiptera: Reduviidae) (DOYLE et al, 2011). Mais de 100 espécies de triatomíneos podem servir como vetor e podem ser encontradas em toda América Latina e no sul dos Estados

Unidos, especialmente em áreas rurais (AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012).

Outra forma de contaminação é via transfusão sanguínea, causando a doença de Chagas aguda ou crônica (ESCH e PETERSEN, 2013). As formas tripomastigotas sanguíneas continuam viáveis nos produtos sanguíneos estocados, especialmente em áreas não endêmicas como Europa, onde não existe controle dessa doença nos bancos de sangue (VIEIRA et al, 2012; AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012).

O parasito também pode ser transmitido congenitamente em 1-10% das gestações, na maioria das vezes em mulheres assintomáticas, causando aproximadamente 14 mil casos da doença de Chagas por ano (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; ESCH e PETERSEN, 2013). A infecção congênita é transplacentária e parece depender de fatores relacionados ao parasito e ao hospedeiro. A severidade da doença de Chagas em neonatos pode variar de infecção assintomática à doença fulminante (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; AYO et al, 2013; ESCH e PETERSEN, 2013;).

A transmissão oral da doença de Chagas pode ocorrer especialmente associada com a contaminação de leite materno, sucos de frutas e vegetais contaminados por insetos vetores infectados, suas fezes ou secreções das glândulas anais. Alimentos e água contaminados com tripomastigotas têm sido identificados recentemente como a causa de vários casos de doença de Chagas aguda (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; AYO et al, 2013).

Outras formas excepcionais de disseminação podem ocorrer, como acidentes ocupacionais envolvendo pesquisadores e técnicos de laboratório que trabalham com o parasito ou com o vetor da doença. A transmissão pelo

coito nunca foi comprovada em humanos. Existem apenas relatos de *T. cruzi* no sangue menstrual de mulheres chagásicas (AYO et al, 2013).

Esforços para reduzir a transmissão do parasito, pelo controle do triatomíneo, têm levado ao declínio das taxas da infecção vetorial e com isso, a doença crônica é agora predominantemente transportada por adultos (WIGGERS et al, 2013). Nos países onde existe a triagem dos doadores de sangue, a incidência de transfusão associada à doença de Chagas tem diminuído nos últimos anos. Entretanto, essa fiscalização dos bancos de sangue e o diagnóstico de doentes em fase crônica continuam sendo o maior desafio (AFONSO, EBELL, TARLETON, 2012; ESCH e PETERSEN, 2013).

4.2.3 Patologia da doença de Chagas

Existem duas fases clínicas, após a entrada do *T. cruzi* em humanos, envolvendo geralmente uma fase aguda oligossintomática até a doença crônica. A variabilidade biológica e genética do parasito e do hospedeiro pode influenciar na progressão da doença. Na fase aguda da infecção, muitos pacientes são assintomáticos ou tem sintomas medianos. Após um período de incubação de 1-2 semanas, a maioria dos indivíduos acometidos irá experimentar uma doença febril não específica (AYO et al, 2013; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; DA SILVA et al, 2012).

O início da fase aguda é caracterizado com alto número de parasitos no sangue e nos tecidos por dois ou quatro meses, assim como pelo alto nível de citocinas plasmáticas e intensa ativação de linfócitos. Os testes sorológicos podem ser negativos nessa fase da infecção. Durante esse período, os níveis

de mortalidade variam de 5% a 10% devido a episódios de miocardite e meningoencefalite. Os sinais clínicos associados com a infecção são: reação inflamatória local com formação de inchaço na região de entrada do parasito (chagoma ou sinal de Romanã), febre, linfadenopatia, esplenomegalia e arritmia cardíaca. Alguns pacientes podem apresentar anorexia, náusea, vômito e diarreia. Eosinofilia não está associada com a infecção aguda na doença de Chagas, mas pode ser acompanhada de anemia, trombocitopenia ou aumento das enzimas hepáticas (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; AYO et al, 2013).

A forma clínica da doença de Chagas oral tem manifestações semelhantes à forma aguda com algumas diferenças. A exposição oral ao parasito resulta em uma síndrome febril de 3 a 22 dias após o contato inicial, com mialgia, colângio-hepatite e gastrite, com epistaxe, hematêmese, e, potencialmente, choque (ESCH e PETERSEN, 2013). Atualmente, países não endêmicos têm adotado diretrizes e práticas para estender as indicações de tratamento para adultos em fase indeterminada da doença ou com cardiopatia leve para prevenir ou atenuar danos cardíacos letais (JACKSON et al, 2013; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012).

Na fase aguda, grande parte dos indivíduos infectados desenvolve resposta imune celular e humoral responsáveis pela diminuição da parasitemia e sintomas dentro de poucos meses. Após esse período, de 50% a 60% dos pacientes progridem para um estágio crônico assintomático, que caracteriza a fase indeterminada da doença de Chagas, e assim permanecem por longos períodos. A fase indeterminada é caracterizada pela presença de anticorpos específicos na ausência de manifestações clínicas relacionadas à infecção pelo

T. cruzi. Além disso, o eletrocardiograma (ECG) e exames de imagens gastrointestinais devem ser normais (AYO et al, 2013; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012).

A maioria dos indivíduos infectados permanece como pacientes assintomáticos geralmente por anos ou décadas. Entretanto, em torno de 20-30% dos acometidos desenvolvem manifestações da doença, associadas a distúrbios cardíacos ou gastrointestinais, característicos da fase crônica da doença de Chagas. (AYO et al, 2013; SAMUELS et al, 2013; DA SILVA et al, 2012). A cardiopatia chagásica é caracterizada por dano progressivo ao miocárdio, causado por extensa inflamação crônica e fibrose. Na fase terminal, geralmente se apresenta como uma cardiomiopatia dilatada. Essa é a manifestação clínica mais relevante, causando morte nos países endêmicos devido à sua frequência e severidade. Oito a 10% dos pacientes tem a forma digestiva da doença crônica, caracterizada pela dilatação do esôfago ou do cólon (megaesôfago e megacólon). Alguns pacientes desenvolvem essas duas formas crônicas associadas, conhecida como forma cardiodigestiva (AYO et al, 2013).

Durante a fase aguda da doença de Chagas, os parasitos podem ser observados no sangue do paciente. Por isso, o diagnóstico pode ser realizado através de esfregaço sanguíneo corado com Giemsa e observado por microscopia direta. A investigação diagnóstica em recém-nascidos também pode ser realizada por esse método, utilizando-se sangue venoso ou do cordão umbilical (RICCIARDI e NDAO, 2015).

O diagnóstico sorológico é utilizado independente do estágio da doença, baseado na detecção de anticorpos específicos para o parasito. Na fase aguda,

o IgM e o IgG na fase crônica e indeterminada da doença. Vários ensaios sorológicos são utilizados incluindo ensaios de imunofluorescência indireta, ensaios enzimáticos ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) e hemoaglutinação (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; AYO et al, 2013).

4.2.4 Morfologia do *Trypanosoma cruzi*

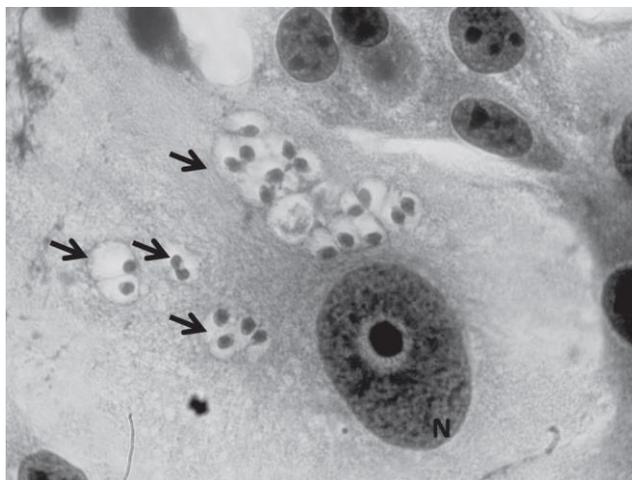
O *T. cruzi* possui três formas evolutivas, bem definidas e morfologicamente distintas, identificadas por microscopia óptica pela posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e pela emergência do flagelo (MARTINS et al, 2012; TEIXEIRA et al, 2012; VIEIRA et al, 2012). Tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares são as formas típicas encontradas nos hospedeiros vertebrados, enquanto que epimastigotas e tripomastigota metacíclicas infectivas estão no inseto vetor (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

A forma amastigota intracelular não apresenta um flagelo exterior e nem membrana ondulante, por isso seu movimento é apenas por rotação, e mede em torno de 4.0µm de diâmetro (**Figura 7**). Essa forma se multiplica por divisão binária longitudinal a cada 12 horas e quando liberadas na circulação, também são capazes de infectar novas células.

A forma epimastigota está no intestino do hospedeiro invertebrado, apresenta um flagelo livre, cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida, medindo entre 20 e 40µm, incluindo o flagelo. É bastante móvel, apresentando intensa atividade replicativa, também por divisão binária longitudinal, e às vezes formam rosetas. Essa forma evolutiva não

resiste à temperatura de 37°C, com melhor desenvolvimento em torno de 20-28°C (WIGGERS et al, 2013; MARTINS et al, 2012; TEIXEIRA et al, 2012).

Figura 7. Formas amastigotas de *Trypanosoma cruzi*



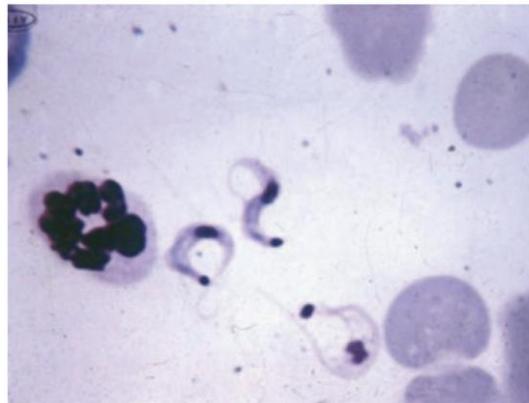
Fonte: MARTINS et al (2012)

Legenda: Amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* infectando células VERO *in vitro*. Setas indicam as amastigotas e N os núcleos da célula hospedeira. Microscopia óptica após coloração com Giemsa. Aumento de 1000X.

A forma tripomastigota não tem capacidade replicativa e corresponde à forma infectiva. A tripomastigota metacíclica é encontrada na porção final do intestino ou nos tubos de Malpighi do vetor e é liberada nas fezes do hospedeiro invertebrado a partir de epimastigotas (WIGGERS et al, 2013; TEIXEIRA et al, 2012; VIEIRA et al, 2012). Mede cerca de 17µm, apresenta um núcleo grande e central, cinetoplasto posterior terminal, flagelo curto emergindo do corpúsculo basal próximo ao cinetoplasto e membrana ondulante estreita (**Figura 8**) (MARTINS et al, 2012).

A forma tripomastigota sanguínea é originada a partir das amastigotas ao final do ciclo e liberada no citoplasma, na corrente sanguínea e em outros fluídos do corpo, como líquido cefalorraquidiano e linfa do hospedeiro vertebrado (WIGGERS et al, 2013; MARTINS et al, 2012; TEIXEIRA et al, 2012).

Figura 8. Formas tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* corados com Giemsa



Fonte: HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI (2012)

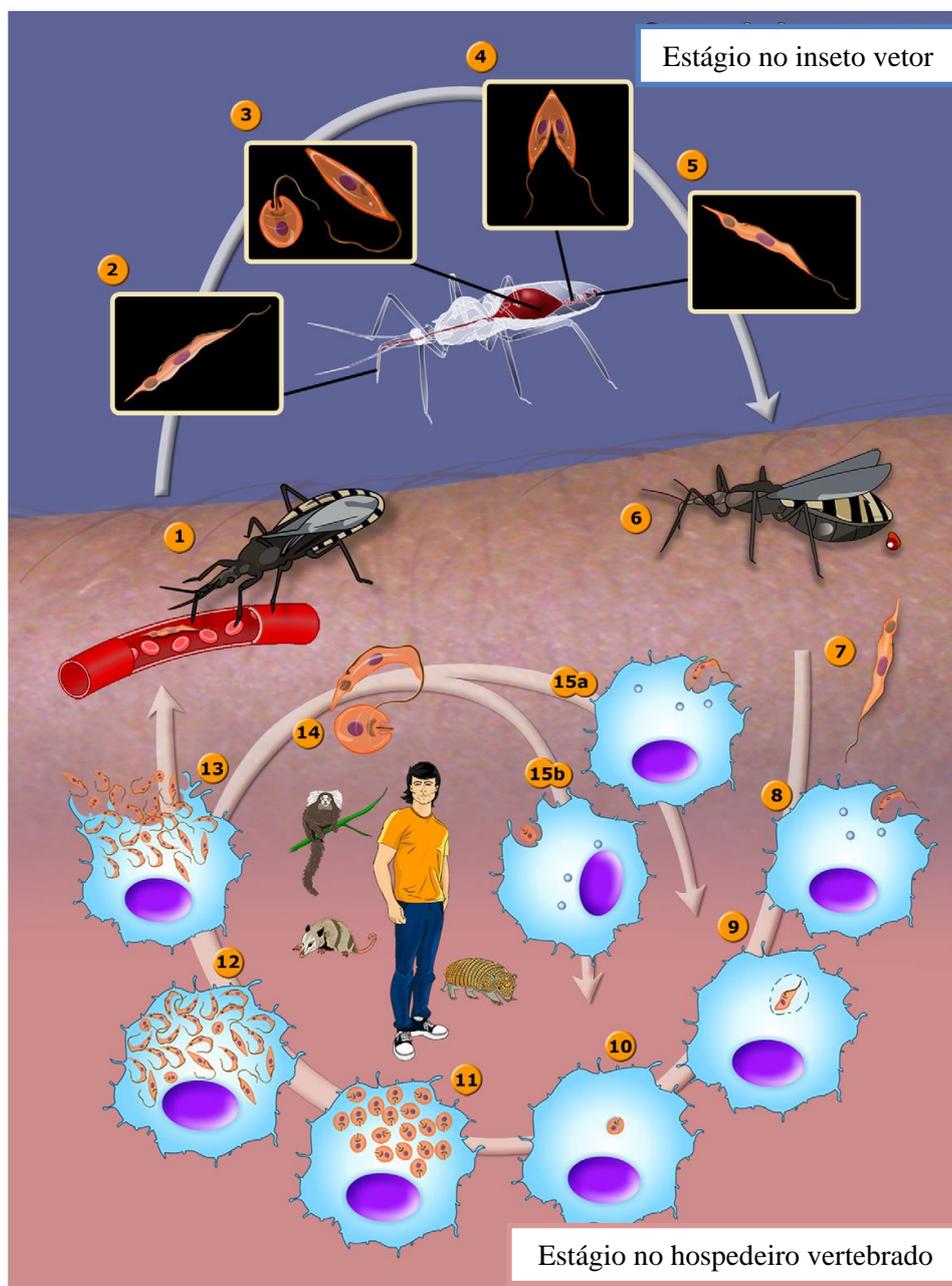
4.2.4.1 *Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi*

Entre os tripanossomatídeos, o *T. cruzi* apresenta um dos mais complexos ciclos de vida, marcado por uma série de transformações com quatro estágios de desenvolvimento encontrados nos hospedeiros, assim como no sangue (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010; SOUZA et al, 2010; MARTINS et al, 2012). O ciclo biológico do *T. cruzi* pode iniciar quando o triatomíneo se alimenta do sangue de vertebrados contaminados com as formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez ingeridas, a maioria das tripomastigotas são lisadas no estômago do inseto. As tripomastigotas que sobrevivem são transformadas em epimastigotas que, depois de vários ciclos de multiplicação, se transformam em tripomastigotas metacíclicas no intestino posterior (SAMUELS et al, 2013). O inseto vetor parece não ser afetado pela infecção com o parasito (RASSI JR, RASSI, MARIN-NETO, 2010).

Durante o repasto sanguíneo, a grande quantidade de sangue no sistema digestivo do vetor, leva à eliminação de fezes e urina contendo

parasitos que podem entrar nas células do hospedeiro mamífero, através de inoculação direta no local da picada, na pele lesionada ou de membranas mucosas intactas (oral, nasal e conjuntiva). Esse estágio é denominado de tripomastigota metacíclico que são infectivos para vários tipos de células de mamíferos, incluindo as de humanos (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012; MARTINS et al, 2012).

No mamífero, as tripomastigotas metacíclicas entram nas células hospedeiras, se transformam em amastigotas, as quais se multiplicam no ambiente intracelular. Finalmente, as amastigotas se transformam em tripomastigotas sanguíneas que são liberadas com a ruptura da célula hospedeira. Essas tripomastigotas sanguíneas infectam as células adjacentes ou se disseminam através dos vasos linfáticos e corrente sanguíneos para infectarem novas células, além de serem ingeridas pelo triatomíneo, completando assim o ciclo de vida do parasito (**Figura 9**) (HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012).

Figura 9. Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

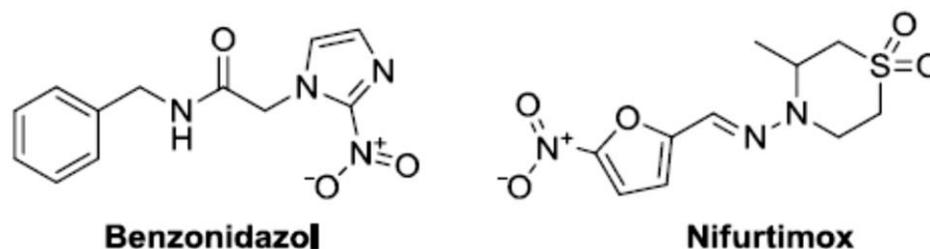
Fonte: Adaptado de Teixeira et al (2012)

Legenda: 1. O inseto vetor (fêmea ou macho) pica o hospedeiro mamífero e ingere tripomastigotas localizadas no sangue. 2. Tripomastigotas metacíclicas. 3. Tripomastigotas se transformam em epimastigotas. 4. Epimastigotas se multiplicam no intestino médio. 5. Epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicas no intestino grosso. 6. O inseto vetor elimina no hospedeiro mamífero tripomastigotas metacíclicas nas fezes próximo ao local da picada depois do repasto sanguíneo. 7. Forma tripomastigotas metacíclicas. 8. Tripomastigotas metacíclicas infecta macrófagos. 9. Tripomastigotas metacíclicas se transformam em amastigota. 10. Amastigota é liberada a partir do vacúolo parasitóforo. 11. Amastigotas se multiplicam no citoplasma. 12. Amastigotas se transformam em tripomastigotas. 13. Tripomastigotas rompem as células. 14. Formas amastigotas e tripomastigotas. 15. (a) Tripomastigotas e (b) amastigotas infectam macrófagos. Na porção central da figura, é mostrado adicionalmente o reservatório mais importante envolvido na manutenção do ambiente doméstico e peridoméstico.

4.2.5 Quimioterapia da doença de Chagas

A doença de Chagas faz parte do grupo de doenças negligenciadas, afetando principalmente populações de baixa renda. Essas enfermidades são caracterizadas por não receberem investimentos em pesquisas, para o desenvolvimento de novas terapias ou vacinas, e nem medidas de controle adequadas. Dessa forma, existem poucos medicamentos disponíveis para o tratamento dessas doenças, acarretando altas taxas de mortalidade e incapacidade entre os indivíduos afetados (MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2015).

A terapia da doença de Chagas, associado ao controle da transmissão vetorial e da contaminação por transfusões sanguíneas, é um dos mais importantes elementos no monitoramento dessa enfermidade, uma vez que ainda não existem vacinas disponíveis para prevenir a infecção (JACKSON et al, 2013; WIGGERS et al, 2013; LEWIS et al, 2015). As drogas utilizadas para esta indicação são baseadas em compostos nitroheterocíclicos, caracterizados por um grupo nitro ligado a um anel aromático, os quais são efetivos contra uma variedade de infecções bacterianas e parasitárias (WILKINSON et al, 2008). Atualmente, as duas drogas registradas para o tratamento da doença de Chagas são Benznidazol (BNZ; LAFEPE– Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco) e Nifurtimox (NFX; Lampit/Bayer Healthcare) (**Figura 10**). Esses medicamentos estão disponíveis há décadas, sendo as únicas opções terapêuticas em áreas endêmicas e não endêmicas (DINIZ et al, 2013; ALONSO-PADILLA, 2015; CHATELAIN, 2015).

Figura 10. Estrutura química do nifurtimox e benznidazol

Fonte: Adaptado de França et al (2008)

A quimioterapia utilizada na doença de Chagas atua na fase aguda da enfermidade, apresentando eficácia variada, e sua atividade durante o período crônico ainda está em estudo. Além disso, as drogas são administradas por longos períodos (90-120 dias) e mostram segurança duvidosa. Frequentemente, são observados diversos efeitos colaterais nos pacientes, incluindo dermatite alérgica, prurido, febre, intolerância gastrointestinal, entre outros, causando a descontinuação do tratamento (ALONSO-PADILLA, 2015; CHATELAIN, 2015; LEWIS et al, 2015).

O Nifurtimox foi a primeira droga usada para o tratamento da forma aguda da doença de Chagas (WILKINSON et al, 2008). Essa droga é administrada em quatro doses de 8–10 mg/kg/d em adultos, 10–12.5 mg/kg/d em adolescentes e 15–20 mg/kg/d em crianças. Nos pacientes que utilizam NFX os efeitos colaterais mais comuns são gastrointestinais e neurológicos (incluindo neuropatia periférica e alterações de humor). Esses indivíduos podem apresentar anorexia, náuseas, vômito e, menos comumente, insônia e mialgia. Devido à baixa eficácia e aos efeitos adversos, o nifurtimox já não está disponível na maioria dos países da América Latina (WIGGERS et al, 2013; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012).

O BNZ é um quimioterápico nitroheterocíclico que possui atividade antiprotozoários e antibacteriana. No entanto, seu interesse clínico restringe-se ao tratamento da doença de Chagas. Essa droga foi produzida pela primeira vez pelo laboratório Hoffman-La Roche, na Suíça e, em 2003, os direitos e a tecnologia de fabricação do BZN foram cedidos ao Brasil (OLIVEIRA et al, 2008). Essa é a droga de escolha adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil, sendo produzido pelo LAFEPE. O BNZ é administrado em doses de 5 mg/kg/d, durante 60 dias e seus efeitos indesejados incluem dermatites alérgicas, supressão da medula óssea, neuropatia periférica, parestesia e anorexia (OLIVEIRA et al, 2008; WIGGERS et al, 2013; HEMMIGE, TANOWITZ, SETHI, 2012).

Devido ao longo tempo de terapia, o tratamento completo, em geral, não é realizado, resultando no desenvolvimento de resistência às drogas (WILKINSON et al, 2008). Além disso, as frequentes falhas na terapêutica são atribuídas a diferenças de suscetibilidade aos compostos nitroderivados (BNZ e NFX), observadas em algumas cepas de *T. cruzi*. Ambos, BNZ e NFX, são pró-fármacos ativados pela mesma nitroredutase mitocondrial, o que pode gerar resistência cruzada. Drogas como os antifúngicos derivados azólicos, incluindo posaconazol, também apresentam problemas de resistência (SOEIRO et al, 2013; CHATELAIN, 2015; LEWIS et al, 2015).

A maioria das avaliações pós-tratamento tem sido realizados em pacientes que utilizaram BNZ. Esta é a droga de primeira escolha devido à melhor tolerância, embora nenhum estudo de segurança e eficácia comparativo entre BNZ e NFX tenha sido realizado (JACKSON et al, 2013). O principal critério para determinar o sucesso da terapia com BNZ e NFX é o retorno da

soronegatividade contra o *T. cruzi*. Acredita-se que a cura parasitológica ocorra em 80% dos pacientes que completam o ciclo total do tratamento de cada droga, embora essa intervenção seja ineficiente em pacientes na fase crônica (DINIZ et al, 2013; JACKSON et al, 2013; WIGGERS et al, 2013). Na doença de Chagas congênita, o tratamento realizado durante o primeiro ano de vida do recém-nascido é efetivo em torno de 60 a 100% dos casos. O diagnóstico precoce e o tratamento específico com BNZ e NFX possibilitam as chances de cura parasitológica total nos pacientes (DINIZ et al, 2013).

Os efeitos colaterais significantes, as taxas de abandono do tratamento e os relatos de falha na terapêutica da doença de Chagas levam à preocupação com a segurança e eficiência dos medicamentos utilizados, fazendo com que a busca de novas drogas seja fundamental (JACKSON et al, 2013; WIGGERS et al, 2013). Entretanto, as iniciativas e os esforços para o descobrimento de drogas antichagásicas era limitado e, adicionalmente, os compostos disponíveis para testes, na maioria das vezes, estavam associados a toxicidade (CHATELAIN, 2015). Outro problema em relação ao desenvolvimento de drogas para a doença de Chagas é a dificuldade em avaliar o sucesso do tratamento, uma vez que as manifestações clínicas aparecem até décadas após a infecção e os parasitos são de difícil detecção no sangue durante a fase crônica (ALONSO-PADILLA, 2015).

Nos últimos dez anos, ocorreram mudanças significantes na área dos ensaios pré-clínicos e clínicos. Esses ensaios são focados em três alvos: esterol 14 α -desmetilase-CYP51, cruzaina e genes associados ao dano no DNA (EKINS et al, 2015). Algumas drogas como o alopurinol e o posaconazol se mostraram efetivas como agentes anti-*T. cruzi* em testes *in vitro* e em modelos

animais (FRANÇA et al, 2014; EKINS et al, 2015). Testes anteriores para avaliar o potencial de compostos azoicos (inibidores da enzima CYP51), na fase crônica da doença de Chagas, apresentaram resultados promissores alcançados com posaconazol e benznidazol (CHAGASAZOL) e ravuconazol (E1224), os quais levaram essas drogas aos ensaios clínicos, mas o resultado de ambos não tem sido o esperado (CHATELAIN, 2015; EKINS et al, 2015).

Ensaio de fase II mostraram o fracasso da triagem CHAGASAZOL que não foi capaz de manter a atividade anti-*T. cruzi*, seis meses após o final do tratamento. Por outro lado, praticamente todos os pacientes tratados com benznidazol não mostraram recidiva (ALONSO-PADILLA et al, 2015; CHATELAIN, 2015). O E1224 apresentou boa segurança e eliminou os parasitos. Entretanto, também não sustentou sua eficácia, um ano após o final do tratamento, em comparação com benznidazol com 80% de manutenção do controle parasitário. Esses estudos concluíram que os compostos azoicos não são eficientes como monoterápicos na fase indeterminada da doença (CHATELAIN, 2015). Adicionalmente, o uso dessas moléculas pode ser limitado, devido ao custo elevado e complexidade de produção (BAHIA et al, 2012; ALONSO-PADILLA, 2015).

Outras drogas em fase de testes clínicos incluem o benznidazol (BENEFIT) que está sendo avaliado desde 2005, visando a prevenção da progressão da doença para a fase cardíaca. Essa triagem está prevista para finalizar em 2015. Já a triagem do STOPCHAGAS (posaconazol em combinação com benznidazol oral) ainda está em andamento (CHATELAIN, 2015).

Os resultados das triagens realizadas até o momento evidenciam um outro problema no descobrimento de novas quimioterapias para a doença de Chagas: a falta de correlação entre os ensaios pré-clínicos e clínicos. Ou seja, existe uma dificuldade em prever a eficácia clínica com base nos resultados de estudos *in vitro* e em modelos *in vivo* (CHATELAIN, 2015). Diante deste contexto, existe uma grande expectativa em relação a descoberta de agentes quimioterápicos menos tóxicos, mais seguros e ativos contra a fase crônica da doença de Chagas, visando melhorar o desempenho de tratamentos atuais (BAHIA et al, 2012; ALONSO-PADILLA, 2015).

4.3 BIOLOGIA CELULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

O *T. cruzi* e a *Leishmania* são organismos eucariotos e, por isso, apresentam membrana nuclear e organelas, como complexo de Golgi, retículo endoplasmático, núcleo, entre outras. Mas, além dessas organelas, possuem algumas estruturas citoplasmáticas próprias da família, como reservossomos, glicossomos e microtúbulos subpeliculares. Nessas organelas ocorrem algumas vias metabólicas que podem ser possíveis alvos terapêuticos, sendo importantes para a investigação de novas drogas (**Figura 11 e 12**) (DE SOUZA, 2008; FIDALGO; GILLE, 2011; TEIXEIRA et al, 2012).

4.3.1. Superfície Celular

A superfície celular dos tripanossomatídeos é basicamente composta pela membrana plasmática, glicocálice e microtúbulos subpeliculares. A membrana plasmática é composta por uma bicamada lipídica constituída por diferentes lipídeos e proteínas, desempenhando a função de adesão do parasito às células epiteliais do intestino do inseto vetor e permitindo sua sobrevivência e diferenciação (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS, 2010). Estudos de ultraestrutura de tripanossomatídeos mostraram que a membrana dos parasitos varia em densidade e distribuição de proteínas integrais da membrana, de acordo com o estágio evolutivo (DE SOUZA, 1999). Na face externa da membrana plasmática encontra-se o glicocálice, uma estrutura formada por glicoproteínas e glicolipídeos, presente em todos os estágios do ciclo de vida do parasito. O glicocálice pode ser responsável pela interação entre o parasito e seu hospedeiro (BRENER et al, 2000; DE SOUZA, 2008).

Os microtúbulos subpeliculares compõem o citoesqueleto dos parasitos e são formados por feixes de proteínas alfa e beta tubulina, organizados paralelamente. Essas estruturas são encontradas abaixo da membrana plasmática do parasito estando conectados entre si, através de filamentos, oferecendo mais rigidez e estabilidade à célula. Os microtúbulos possuem importante função estrutural, sendo responsáveis pelas diferentes formas do parasito. Além disso, estão associados à membrana, permanecendo unidos após a lise celular (MATTOS et al, 2012).

4.3.2 Flagelo, Bolsa Flagelar e Citóstoma

Os parasitos da família Trypanosomatidae possuem um flagelo, uma estrutura constituída por microtúbulos, responsável pela mobilidade celular e adesão do parasito à superfície das células dos hospedeiros (DE SOUZA, 2008; MATTOS et al, 2012). Durante o ciclo celular, o flagelo apresenta variações de comprimento, ponto de emergência e posição (ROTUREAU et al, 2009). Todas as formas evolutivas desses parasitos possuem flagelo, incluindo as formas amastigotas. Nas formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* e promastigota de *Leishmania* sp. o flagelo se liga ao corpo do parasito em uma região denominada zona de adesão flagelar (DE SOUZA, 2008).

Nos tripanossomatídeos as funções de endocitose e exocitose são realizadas pela bolsa flagelar, uma invaginação da membrana plasmática que emerge lateralmente ao flagelo e é ligada ao corpo celular na região anterior do parasito. Nesse compartimento, o parasito secreta macromoléculas e absorve nutrientes do meio externo. Essa região é altamente especializada, devido à ausência de microtúbulos subpeliculares associados à sua membrana, e a composição proteica da sua membrana externa é bioquimicamente distinta da membrana do flagelo e do corpo celular (FIGUEIREDO et al, 2000; DE SOUZA, 2002a; BONHIVERS et al, 2008; ROCHA et al, 2010).

Além da bolsa flagelar, o *T. cruzi* possui uma outra estrutura denominada de citóstoma/citofaringe, constituído por uma invaginação da membrana plasmática (citofaringe) e que se abre para o meio externo (citóstoma) localizada lateralmente ao corpo da célula, próximo à região da bolsa flagelar. O citóstoma está presente apenas nas formas epimastigotas e

amastigotas e também está envolvido na captação de macromoléculas essenciais, sendo responsável por 85% da atividade endocítica do parasito (FIGUEIREDO et al, 2000; PORTO-CARREIRO et al, 2000; NAKAMURA, NAKAMURA, DE SOUZA, 2005).

4.3.3 *Acidocalcisoma*

Os acidocalcisomas são estruturas citoplasmáticas encontradas nos membros da família Trypanosomatidae e também estão presentes em bactérias, fungos, algas e em protozoários. Essas estruturas são organelas eletrondensas acídicas responsáveis pelo armazenamento de uma alta concentração de fósforo, encontrados como pirofosfato e polifosfato, complexados com cálcio, e pela manutenção do equilíbrio de íons como magnésio, sódio, potássio e zinco (DO CAMPO et al, 2005; DOCAMPO & MORENO, 2008). Nos tripanosomatídeos os acidocalcisomas variam em sua localização e número entre as espécies e suas formas evolutivas. Essas organelas também desempenham uma função importante na resposta ao estresse osmótico e na manutenção do pH dentro da célula (DE SOUZA, 2002b; MORENO & DOCAMPO 2009).

4.3.4 *Glicossomos*

O glicossomo é uma organela esférica ou alongada, com aproximadamente 0,2-0,3 μm , envolvidos por uma unidade de membrana com uma matriz homogênea e fracamente eletrondensa. Essa organela é semelhante e evolutivamente relacionada ao peroxissomo, estando distribuído por toda célula. Em protozoários cinetoplastidas, várias vias

metabólicas, incluindo glicólise e biossíntese de lipídeos, são localizados nessa organela. Nos glicossomos ocorre a maioria dos processos glicolíticos, onde enzimas glicolíticas ocupam 90% do conteúdo proteico dessa organela em *T. brucei* (MICHELS et al, 2006; COLASANTE et al, 2013; CULL et al, 2014).

O número de glicossomos, seu conteúdo e a área que ocupam no citoplasma variam de acordo com as espécies de tripanossomatídeos e até mesmo entre os estágios de desenvolvimento no ciclo biológico desses protozoários (MICHELS et al, 2006). Estudos em leishmanias e tripanossomas tem mostrado que a biogênese adequada de glicossomos e o direcionamento correto de enzimas glicossomais são essenciais para a sobrevivência do parasito, tornando essa organela um alvo atraente para o desenvolvimento de novas drogas (PARSONS, 2004; COLASANTE et al, 2013; CULL et al, 2014).

4.3.5 Megassomos

A forma amastigota intracelular possui um grande compartimento lisossomal característico, denominado de megassomo, podendo variar em tamanho e número de acordo com a espécie de *Leishmania*. Os megassomos são estruturas eletrondensas, delimitadas por membranas abundantes no citoplasma, com matriz heterogênea, inclusões e vesículas (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; CULL et al, 2014). Através da citoquímica ultraestrutural, mostrou-se que o megassomo contém fosfatase ácida e cisteíno-protease correspondendo a um lisossomo típico (BOUKAI et al, 2000). Essa organela e seus constituintes podem estar diretamente envolvidos na infectividade e virulência da *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA; ATTIAS; DE SOUZA, 2007).

4.3.6 Mitocôndria e cinetoplasto

Os tripanossomatídeos, como *T. cruzi* e o gênero *Leishmania*, possuem uma única mitocôndria que se estende por todo o corpo celular, contendo funções e estrutura análogas a das demais células eucarióticas (FIDALGO; GILLE, 2011). Em uma região específica desta organela está presente uma estrutura complexa formada de DNA, chamada de cinetoplasto, que varia sua ultraestrutura de acordo com o estágio evolutivo do parasito (SOUZA, 2002b; DE SOUZA, 2008).

O DNA do cinetoplasto é conhecido como kDNA e representa 30% do material genético total da célula. Ele é composto de moléculas circulares que, juntas e interconectadas, formam uma rede única. Dois tipos de anéis de kDNA podem ser encontrados, os minicírculos e os maxicírculos. Os maxicírculos são estruturalmente e funcionalmente homólogos ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores e responsáveis por codificar RNAs ribossomais para inúmeras proteínas, muitas delas com funções vitais à célula, como as envolvidas com os mecanismos de transdução de energia (DE SOUZA, 2008; CAVALCANTI et al, 2009). Os minicírculos correspondem a aproximadamente 90% do total da massa de DNA mitocondrial e sua principal função é codificar pequenos RNAs guias que controlam a especificidade de edição do RNA nesta organela (SCHNEIDER, 2001).

4.4 FERRAMENTAS E PROCEDIMENTOS UTILIZADOS PARA A TRIAGEM DE DROGAS

4.4.1 Tecnologia de genes repórteres

A introdução de novas tecnologias tem promovido grandes mudanças na área do descobrimento de drogas, como o uso dos genes repórteres. Esses genes codificam proteínas que possuem um fenótipo facilmente mensurável e distinto das proteínas endógenas (ADRIANI et al, 2011; DUBE et al, 2009; SERENO et al, 2007). Bactérias, vírus e parasitos fluorescentes podem ser obtidos após a transfecção com genes que codificam proteínas fluorescentes (GUPTA; NISHI 2011). O uso desta ferramenta para quantificar o crescimento celular diminui problemas convencionais na triagem de drogas, como tempo e trabalho manual excessivo, oferecem maior sensibilidade e permitem selecionar um maior número de moléculas candidatas (ANDRIANI et al, 2011; DUBE et al, 2009; SERENO et al, 2007). Além disso, tecnologias emergentes, utilizando fluorescência ou bioluminescência, têm sido adaptadas para o estudo de interações parasito-hospedeiro, visando descrever mecanismos moleculares (BOLHASSANI et al, 2011).

Dependendo da aplicação, um gene repórter ideal deve ser ausente no hospedeiro, inerte, não deve afetar a fisiologia da célula parasitária e representar um ensaio de quantificação simples, sensível e de baixo custo (DUBE et al, 2009). Os genes repórteres podem ser classificados como intracelulares e extracelulares. Dentre os intracelulares mais utilizados estão Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT), β -galactosidase (β -gal), proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*- GFP), luciferase e glucuronidase.

Produtos dos genes repórteres extracelulares incluem o hormônio do crescimento humano e fosfatase alcalina secretada (BOLHASSANI et al, 2011).

Alguns genes repórteres, como β -gal e GFP, têm sido efetivamente empregados em triagens de drogas contra parasitos (GUPTA; NISHI, 2011). β -gal, o produto do gene bacteriano lacZ, tem sido extensivamente utilizado, porque oferece opções de detecção, dependendo do substrato utilizado. A expressão do β -gal em parasitos foi relatada pela primeira vez em *Toxoplasma gondii*. Posteriormente, foi expresso em espécies de *Plasmodium*, *Leishmania* e *Trypanosoma* (DUBE et al, 2009). A tecnologia do gene repórter β -gal pode ter algumas limitações, como o grande tamanho da proteína expressa (116 kDa) e a expressão endógena em algumas linhagens de células de mamíferos, o que pode impossibilitar sua aplicação em triagens de drogas contra parasitos intracelulares (SERENO et al, 2007; DUBE et al, 2009).

Embora alguns inconvenientes possam existir, desde o desenvolvimento de *T. cruzi* recombinantes, grandes mudanças têm sido introduzidas na área do descobrimento de drogas para doença de Chagas (CHATELAIN, 2015; MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2015). O primeiro exemplo é a cepa de *T. cruzi* transgênico, expressando a enzima repórter β -gal, que tem permitido ensaios de triagem de alto rendimento (*High-throughput screening*-HTS) para compostos com atividade anti-*T. cruzi* em células hospedeiras. A triagem de drogas em modelos animais com *T. cruzi* também tem sido feita de modo mais rápido e simples com o uso de parasitos recombinantes fluorescentes ou luminescentes (ANDRIANI et al, 2011).

A proteína GFP é estável e auto fluorescente, sendo originada da água-viva *Aequorea victoria* e de várias espécies de corais (SERENO et al, 2007). A

expressão de GFP em várias espécies de parasitos, incluindo *Plasmodium*, *Trypanosoma*, *Toxoplasma* e *Entamoeba*, têm sido relatada e aplicada em estudos de avaliação de drogas (DUBE et al, 2009). Em *Leishmania*, a expressão de GFP foi realizada pela primeira vez por Ha e colaboradores (1996) e, desde então, tem sido realizada em outras espécies. O uso de *L. amazonensis* recombinante com o gene para GFP otimizada (*enhanced green fluorescent protein- eGFP*) ou β -gal foi descrito em estudos de triagem de drogas (GUPTA; NISHI, 2011). Dube e colaboradores (2009), também ressaltaram as vantagens do uso de GFP em um ensaio de triagem intramacrófago com amastigotas transfectadas de *L. donovani*. Esses testes mostram muitas vantagens, incluindo simplicidade, fácil monitoramento, baixo custo e melhoramento da biossegurança, facilitando as metodologias utilizadas para o descobrimento de novos candidatos a fármacos (DUBE et al, 2009).

4.4.2 Cultivo axênico de formas amastigotas do gênero *Leishmania*

Nas pesquisas de drogas leishmanicidas, os diversos tipos de metodologias utilizados para a triagem dos compostos, tem impacto direto sobre a escolha do estágio evolutivo do parasito empregado (promastigotas *versus* amastigota intracelular) (CALLAHAN et al, 1997). As formas promastigotas de *Leishmania* são utilizadas como alvos nas triagens primárias, porque são simples de cultivar e manipular. Essas características permitem utilizar essa forma evolutiva para avaliar vários compostos rapidamente. Entretanto, essa é uma técnica limitada, visto que as formas promastigotas estão presentes no inseto vetor, não sendo o alvo apropriado para uma droga anti-*Leishmania* (HABIBI et al, 2008).

A forma amastigota intracelular é obtida através de cultivos *in vitro* de macrófagos peritoneais de camundongos ou por meio de outros macrófagos de linhagens celulares (HABIBI et al, 2008). Esta é uma das razões pela qual os testes de triagens, utilizando a forma amastigota, são tecnicamente mais difíceis e apresentam um custo mais elevado. Para essa finalidade, o ideal é combinar as duas vantagens: uma seleção rápida de compostos e que utilize a forma clinicamente relevante do parasito (CALLAHAN et al, 1997; DE MUYLDER et al, 2011). Condições de manutenção para amastigotas axênicos têm sido desenvolvidas e vários laboratórios têm cultivado essa forma evolutiva de *Leishmania* pela combinação de um pH ácido e elevadas temperaturas (DE MUYLDER et al, 2011).

Amastigotas axênicos de *Leishmania*, expressando genes repórteres, têm sido utilizadas em protocolos de triagem de compostos, apresentando várias vantagens (GUPTA; NISHI, 2011). Esses testes são direcionados contra o estágio relevante do parasito, apresentam manipulação simples, assim como o modelo de promastigota, a quantificação da atividade das drogas é fácil e geralmente não apresenta custo elevado. Essas características facilitam os ensaios de triagem em larga escala e colaboram com a identificação de novas drogas para a terapia anti-*Leishmania* (DE MUYLDER et al., 2011).

4.4.3 Tecnologias para ensaios em alta vazão

Os protozoários parasitos apresentam grande complexidade, assim como seus ciclos biológicos, suas formas de transmissão e os diversos mecanismos utilizados para evadir o sistema imune do hospedeiro. Dessa

forma, tais organismos são considerados um grande desafio para os programas de pesquisa e desenvolvimento (P&D) de fármacos (EKINS et al, 2015; MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2015). A área de P&D de novos tratamentos para doenças negligenciadas, como leishmanioses e doença de Chagas, tem encontrado problemas, como a escassez de alvos moleculares validados e de ensaios que reproduzam o comportamento dos organismos. Esses inconvenientes levam a maior dificuldade no descobrimento de drogas baseados em alvos específicos (EKINS et al, 2015; MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2015).

Diante desse contexto, o reconhecimento da necessidade de obtenção e identificação de novas moléculas bioativas tem impulsionado colaborações entre fundações, agências e Universidades. Estas parcerias buscam oferecer novas estratégias para melhorar o processo de P&D, oferecendo suporte à descoberta de agentes antiparasitários (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011; MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2015).

Antigamente, as triagens de compostos eram realizadas através da contagem dos parasitos, por microscopia, sendo um trabalho intenso, lento e limitado para determinar a atividade de moléculas (BUCKNER et al, 1996). A partir de 1980, a indústria farmacêutica passou a aperfeiçoar as técnicas de ensaios de triagem, utilizando os avanços obtidos nas áreas de biologia molecular e engenharia genética (EKINS et al, 2015). As metodologias utilizadas para o planejamento de fármacos e seleção de substâncias bioativas têm sido focadas em proteínas alvo promissoras, ensaios fenotípicos robotizados de HTS e triagem virtual. Essas técnicas ocupam papel de

destaque na identificação de novas drogas (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011).

A metodologia HTS permite avaliar, *in vitro*, até milhões de compostos, frente a uma proteína alvo ou sistema celular definido, com rapidez, eficiência, baixo custo e confiabilidade (GUPTA; NISHI, 2011; EKINS et al, 2015). Os processos de HTS evoluíram nas últimas décadas, graças a tecnologia da robotização e de equipamentos automatizados que tornaram possível a realização desses ensaios miniaturizados (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011). As triagens em HTS também podem utilizar ferramentas com manipulações bioquímicas e celulares, deixando o processo mais racional. Além disso, os ensaios fenotípicos podem ser o ponto de partida para a descoberta de medicamentos, especialmente para doenças infecciosas, onde alvos de drogas são mal compreendidos (EKINS et al, 2015). Entretanto, os resultados dessas triagens devem ser verificados em modelos animais (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011; GUPTA; NISHI, 2011).

É importante destacar que as grandes indústrias farmacêuticas do mundo têm investido em infraestrutura para a realização do método HTS na área de P&D de drogas. Buckner e colaboradores (1996) desenvolveram um método de triagem clássico, utilizando *T. cruzi* expressando β -gal com posterior leitura da absorbância, que foi aplicado por diversos laboratórios acadêmicos em pequena escala. Essa metodologia foi capaz de identificar compostos com atividade específica anti-*T. cruzi*. A partir de então, várias adaptações foram desenvolvidas para o formato HTS (CHATELAIN, 2015). O instituto Broad adaptou este método para o formato de placas com 384 poços e realizou uma triagem com 300 mil compostos. Já a GlaxoSmithKline da Espanha,

recentemente, fez uma triagem com cerca de 2 milhões de compostos (PEÑA et al, 2015). Dessa forma, o método HTS tem levado à descoberta de novas moléculas bioativas (*hits*) no meio acadêmico, na indústria e no setor das organizações sem fins lucrativos (CHATELAIN, 2015; EKINS et al, 2015).

Apesar dos avanços obtidos com o emprego do HTS, existem algumas limitações, como a elevada porcentagem de compostos falso-positivos identificados nas triagens primárias e a desconexão entre os compostos selecionados e os ensaios clínicos. Dessa forma, após a identificação de moléculas bioativas é necessário a realização de ensaios secundários para a confirmação e validação dos resultados, permitindo a priorização de compostos (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011).

Os HTSs primários frequentemente não utilizam a forma evolutiva adequada como alvo apropriado para uma droga leishmanicida ou tripanocida (DE MUYLDER et al, 2011). Dentro desse contexto, formas amastigotas passaram a ser testadas no modo HTS. Entretanto, comparações entre amastigotas axênicos e amastigotas isoladas, a partir de macrófagos, de *L. infantum* têm mostrado diferenças em vários processos celulares, incluindo metabolismo, transporte intracelular e resposta ao estresse oxidativo (DE MUYLDER et al, 2011).

Compostos ativos, frente à formas axênicas, podem ser incapazes de alcançar amastigotas intracelulares por não atravessarem as membranas celulares ou manterem a estabilidade em pH baixo. Em contrapartida, outros compostos precisam ser metabolizados por macrófagos para tornarem-se ativo. Ainda, o próprio macrófago pode ser o alvo direto, levando à inibição do crescimento do parasito (DE MUYLDER et al, 2011). Esses fatos destacam a

importância de um ensaio com a forma amastigotas intracelular para comprovar a ação dos compostos frente à forma relevante do parasito, representando o modelo de doença humano, no qual o composto possa atravessar a célula hospedeira até alcançar o alvo final (FREITAS-JUNIOR et al, 2012; EKINS et al, 2015).

O método HTS utilizando amastigotas intracelulares foi relatado pela primeira vez em 2010, como uma triagem secundária. Esse ensaio tinha como objetivo confirmar a atividade de compostos selecionados como ativos contra a forma promastigota de *Leishmania* (SIQUEIRA-NETO et al, 2010). Em 2011, essa metodologia foi adaptada para o formato de placas com 96 poços, visando selecionar uma pequena amostragem de compostos (DE MUYLDER et al, 2011). Adicionalmente, estudos semelhantes também demonstraram a triagem de drogas contra amastigotas de *T. cruzi* expresando genes repórteres (CANAVACI et al, 2010). Esses trabalhos destacam a importância de procedimentos realizados com amastigotas intracelulares, levando em consideração aspectos cruciais da sua biologia e possibilitando identificar fatores do hospedeiro que atuam na infecção (DE MUYLDER et al, 2011; FREITAS-JUNIOR et al, 2012).

Além disso, a utilização de programas específicos de imagem, aliados ao HTS, têm sido útil para determinar não apenas o número de células infectadas, mas também o número de parasitos que continuam expostos aos compostos (CHATELAIN, 2015). Dessa forma, a análise de imagens permite triar um grande número de compostos em um ensaio fenotípico complexo, utilizando células infectadas com os parasitos (GUPTA; NISHI, 2011). Siqueira-Neto e colaboradores (2010) desenvolveram um ensaio anti-*Leishmania* com

macrófagos de linhagem infectados com amastigotas de *L. donovani*, utilizando um microscópio automatizado modelo Opera para a obtenção das imagens. Recentemente, Alonso-Padilla e colaboradores (2015) estabeleceram uma triagem utilizando mioblastos infectados com *T. cruzi*. Esse ensaio tem a capacidade de mensurar a atividade antiparasitária e a toxicidade na célula hospedeira em um único experimento, permitindo a identificação direta dos compostos seletivos para o parasito (ALONSO-PADILLA et al, 2015).

O impacto positivo do método HTS é observado através do número expressivo de estudos desenvolvidos nas últimas décadas e que possibilitaram o desenvolvimento de moléculas com potencial terapêutico. Esse método deverá ser cada vez mais explorado pelos laboratórios acadêmicos e indústrias farmacêuticas. Adicionalmente, as colaborações entre o setor público e privado, promovem a junção entre a pesquisa básica e medicinal, facilitando a descoberta de novos fármacos. Além disso, novas tecnologias aplicadas na descoberta de drogas em outras áreas terapêuticas também podem ser implementadas na pesquisa para doenças negligenciadas (FERREIRA, OLIVA, ANDRICOPULO, 2011; MARTIN-PLAZA; CHATELAIN, 2015).

4.5 HIDRAZONAS: POTENTES AGENTES ANTIPARASITÁRIOS

As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos que apresentam a estrutura geral $R_1R_2C=NNH_2$. A combinação das hidrazonas com outros grupos funcionais originam compostos com características físicas e químicas únicas que constituem importantes classes de moléculas para o desenvolvimento de novas drogas (PADMINI et al, 2013; VERMA et al, 2014).

Diversas atividades biológicas de moléculas derivadas de hidrazonas são conhecidas, como propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antitumoral (ALTINTOP et al, 2012; ASLAN, OZCAN, KARACAN, 2012; SECCI et al, 2012; DANDAWATE et al, 2012; WANG, YANG, LIU, 2013). Além disso, esses compostos apresentam atividade antiparasitária relatada, como antimalárica (WALCOURT et al, 2004), tripanocida (CARDOSO et al, 2014; MOREIRA et al, 2014a) e anti-esquistossomótica (PEREIRA et al, 1995; SANTIAGO et al, 2014).

Entre os alvos investigados para o desenvolvimento de novas drogas tripanocidas, um dos mais promissores é a cruzaina, considerada a principal cisteína protease do *T. cruzi*. A cruzaina é liberada em todos os estágios de vida do parasito e possui papel essencial no seu ciclo de vida (LEITE et al, 2007; HERNANDES et al, 2010; CARDOSO et al, 2014). Baseadas nisto, pesquisas recentes identificaram moléculas que atuam inibindo essa enzima, como uma possibilidade para a obtenção de novos agentes antichagásicos (CARDOSO et al, 2014; MOREIRA et al, 2014a; EKINS et al, 2015). Além disso, alguns desses compostos foram capazes de reduzir a parasitemia em ratos infectados com *T. cruzi* e apresentaram baixa toxicidade nesses modelos animais, mostrando a cruzaina como um alvo atrativo (BRAK et al, 2010; DOYLE et al, 2010).

Em estudos anteriores, diversos grupos derivados de hidrazonas, como tiazóis, tiossemicarbazonas e semicarbazonas, foram sintetizadas e avaliadas *in vitro*, como inibidores da cruzaina. Entre esses compostos, 24 tiossemicarbazonas foram hábeis em inibir a enzima e não foram citotóxicas nas concentrações tripanocidas. Adicionalmente, a maioria dessas moléculas

apresentou ação protetora em macrófagos frente à infecção com culturas de amastigotas de *T. cruzi* (DU et al, 2000; DU et al, 2002). Um estudo de relação estrutura-atividade identificou diversos análogos dessas moléculas com valores de IC₅₀ (concentração inibitória de 50% do crescimento) em concentrações nanomolares (DU et al, 2002).

Derivados de hidrazonas também apresentaram atividade anti- *T. cruzi* em estudos *in vivo*, com redução de 50-60% da parasitemia e aumento da sobrevivência dos animais. Esse estudo demonstra que os compostos são promissores, justificando futuras investigações por períodos mais longos de tratamento, buscando avaliar seu perfil de toxicidade, entre outros (SALOMÃO et al, 2010).

As tiossemicarbazonas são um importante grupo de moléculas sintéticas com diversas propriedades biológicas, tais como antibacteriana (KHAN e YUSUF, 2009), antiparasitária (SOARES et al, 2011), antiviral, antitumoral e antifúngica (BERALDO e GAMBINO, 2004). Devido a esse extenso perfil farmacológico, esses compostos vêm sendo intensamente estudados. As tiossemicarbazonas quando associadas a complexos metálicos, ou na presença de diferentes grupos substituintes, melhoram suas propriedades biológicas, como o aumento da atividade, e causam menos citotoxicidade às células de mamífero (BRITTA et al, 2012; BRITTA et al, 2014).

Os principais alvos celulares de algumas tiossemicarbazonas foram relatados anteriormente, variando desde alvos moleculares e químicos até disfunções de organelas, como a mitocôndria. Em geral, esses mecanismos de ação envolvem inibição de enzimas, interações com o DNA ou inibição da síntese do DNA (BRITTA et al, 2012; BRITTA et al, 2014).

As tiazolil-hidrazonas (bioisómeros cíclicos das tiossemicarbazonas) se destacam por possuírem ampla atividade biológica e, especialmente, antiparasitária (HERNANDES et al, 2010; CARDOSO et al, 2014). Além disso, estudos *in silico* sugerem que tiazolilhidrazonas possuem como alvo a cruzaina (MOREIRA et al, 2014a).

Tiazóis têm despertado o interesse dos químicos medicinais por causa de suas atividades biológicas, como ações antibacteriana, antifúngica e anti-inflamatória (HOLLA et al, 2003; BONDOCK, KHALIFA, FADDA, 2007; TURAN-ZITOUNI et al, 2008; CHIMENTI et al, 2011). Também existem relatos de efeitos supressores contra infecções por *T. cruzi* em experiências com animais (GRAEBIN et al, 2009). Uma série de compostos foi desenvolvida, com função de tiazol na sua estrutura, a qual apresentou excelente atividade *in vitro* contra cepas de epimastigota, tripomastigota e amastigota do *T. cruzi*. Esses estudos indicam que o núcleo tiazol é bastante importante como um protótipo estrutural a fármaco antichagásico (CAPUTTO et al, 2011; CAPUTTO et al, 2012).

Nos últimos anos, nosso grupo de pesquisa tem investigado hidrazonas como inibidores da cruzaina, entre eles tiossemicarbazonas, N-acilhidrazonas e tiazolinonas. Essa última classe apresentou um composto com valores de IC₅₀ de 10 $\mu\text{M} \pm 0.09$ em células infectadas, valores similares ao benznidazol, fármaco em uso na terapia antichagásica (MOREIRA et al, 2014b).

Derivados de tiazolinonas possuem atividade antibacteriana, antituberculosa, antifúngica, antiparasitária, entre outros (ULUSOY et al, 2000). Triagens anteriores com tiossemicarbazonas e semicarbazonas evidenciaram que as tiossemicarbazonas possuem atividade contra a cruzaina, indicando

que diferenças eletrônicas entre um átomo de enxofre e oxigênio resultam em diferenças na atividade biológica (LEITE et al, 2006).

O desenvolvimento dessas novas classes de agentes antiprotozoários, via inibição das proteases dos parasitos, constitui um importante avanço nas pesquisas para as doenças tropicais negligenciadas, uma vez que essas enzimas são alvos validados, possuindo importância na replicação e diferenciação celular do parasito (CAZZULO, 2002; HERNANDES et al, 2010; CARDOSO et al, 2014). Além disso, são encontradas em protozoários do gênero *Leishmania*, *Plasmodium* e em espécies de *Trypanossoma*.

Dessa forma, as diversas propriedades biológicas de hidrazonas e derivados, assim como os supostos alvos de atuação, tamanho pequeno das moléculas e baixo custo de produção, sugerem que essa classe de compostos seja um atrativo para a busca de novas quimioterapias contra as doenças negligenciadas (DU et al, 2002; LEITE et al, 2006).

CAPÍTULO I

Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas Candidatas a Fármacos Leishmanicida

5 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) na América Latina é uma doença endêmica, considerada um problema de saúde pública. Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha para o tratamento da LV e, Anfotericina B, Miltefosine e Paramomicina são adotadas como segunda opção. Devido ao aparecimento de resistência a essas drogas e efeitos adversos associados ao tratamento, a busca por novos fármacos tem se tornado mais urgente (GUHA et al, 2014).

Na área de descoberta de novas drogas contra doenças infecciosas, o ensaio de alto rendimento (*High-throughput screening*-HTS) é uma importante ferramenta para triagem e identificação de compostos bioativos frente à *Leishmania*. Ainda, as abordagens de alto rendimento, associadas à imagens confocais (*high content*), são utilizadas para melhor analisar os dados provenientes entre a interação do parasito com a célula hospedeira. Atualmente, ensaios, baseados nesse método têm sido descritos frente a tripanossomatídeos, buscando realizar triagens de moléculas de forma mais eficiente (ALONSO-PADILLA et al, 2015; PEÑA et al, 2015). Além disso, esses ensaios permitem analisar o perfil de citotoxicidade das drogas testadas e a atividade leishmanicida sobre a forma mais relevante do parasito em um único experimento (ALONSO-PADILLA et al, 2015).

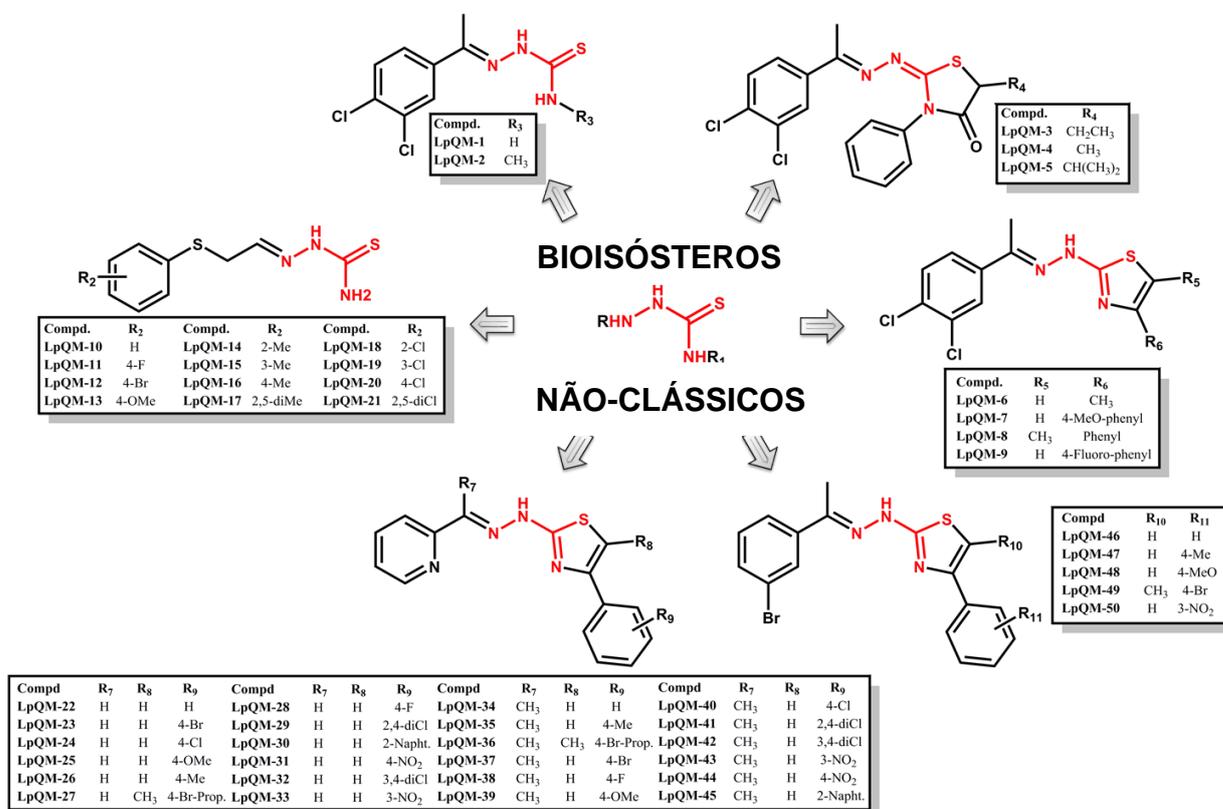
Dentro desse contexto, o objetivo do presente trabalho é verificar a possível citotoxicidade e realizar a triagem de 50 compostos do tipo hidrazonas, utilizando o método HTS associado à imagens, e realizar estudos de mecanismo de ação frente à *Leishmania sp.*

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 COMPOSTOS

Os compostos utilizados nesse estudo foram sintetizados no Laboratório de Planejamento em Química Medicinal–LpQM da Universidade Federal de Pernambuco–UFPE. Os 50 compostos (**Figura 13**), utilizados nos ensaios de triagem, foram pesados, registrados e dispensados em placas de 1.536 e 384 poços na farmacêutica GlaxoSmithKline (GSK)/Espanha. DMSO (Dimetilsulfóxido) a 1% foi utilizado como veículo. Todos os compostos foram caracterizados por estudos de espectroscopia de infravermelho, ressonância magnética nuclear e espectrometria de massa. Uma análise confirmou o grau de pureza dos compostos > 95 %.

Figura 13. Coleção de compostos testados



Fonte: elaborado pela autora (2015)

6.2 PARASITOS E LINHAGENS CELULARES

As seguintes células foram utilizadas neste estudo: células THP-1 (linhagem celular da leucemia humana aguda monocítica), células HepG2 (células de hepatoma humano) cedidas pelo Departamento de Desenvolvimento de Reagentes e Ensaio biológicos-GSK (BRAD, Stevenage, UK). Todas essas linhagens celulares foram cultivadas de acordo com Peña e colaboradores (2015).

Células THP-1 foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 mM de tampão reacional HEPES, 2 mM de L- glutamina e 5 mM piruvato sódico. Os cultivos foram semeados a uma densidade celular entre 1×10^5 a 5×10^5 células/ml e mantidos a 37°C e 5% CO₂. As passagens de células ocorreram antes que chegassem a uma densidade superior a 1.5×10^6 células/ml. Para a diferenciação a macrófagos, os cultivos de células THP-1 eram centrifugados durante 3 minutos a 900 rpm e ressuspensas em meio de cultivo completo com Forbol 12-miristato 13-acetato (PMA). As células eram mantidas em meio com PMA 30 nM a 37°C e 5% CO₂ em garrafas T-Flask de 175 ou 225 cm². Os macrófagos diferenciados eram recuperados descolando as células das paredes da garrafa de cultivo ao incubá-las em presença de tripsina. As células eram então ressuspensas em meio de cultivo completo e, após a contagem no contador de células CASY (Roche), ajustadas para a concentração desejada.

Células HepG2 (células de hepatoma humano) foram cultivadas de acordo com Peña et al (2015), utilizando-se meio Eagle's MEM (do inglês

Minimum Essential Medium) suplementado com 10% de SFB, 1% de NEAA (*Non-Essential Amino Acids Solution*) e 1% de penicilina/estreptomicina.

Formas amastigotas e promastigotas axênicas de *Leishmania donovani* (MHOM/SD/62/1S-CL2D, LdBOB), expressando eGFP, foram gentilmente cedidas pelo Dr. De Rycker da Universidade de Dundee e mantidas em meios específicos como descrito anteriormente (DE RYCKER et al, 2013). A cada cinco semanas, os cultivos dos parasitos foram reciclados entre os estágios de desenvolvimento. Para diferenciação em amastigotas, promastigotas metacíclicas foram inoculadas em meio específico para amastigotas criado pela GSK (não divulgado). Para o procedimento inverso, amastigotas foram cultivadas em meio M199 (*Medium 199*) (Sigma-Aldrich) modificado para promastigotas.

Formas promastigotas de *L. chagasi* (MHOM/BR/70/BH46) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Carlos Alves do Departamento de Parasitologia do CPqAM/FIOCRUZ. Os parasitos foram mantidos a 26°C em meio Schneider (Sigma-Aldrich) suplementado com 20% de SFB e utilizados em fase exponencial de crescimento em todos os experimentos.

6.3 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE

Os ensaios de citotoxicidade em células HepG2 foram realizados na farmacêutica GSK/Espanha de acordo com Peña et al (2015). Células HepG2 em fase exponencial de crescimento foram removidas da garrafa de cultura de células T-Flask de 175 cm² utilizando-se meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM) suplementado com 10% de SFB, 1% de NEAA e 1% de solução

penicilina/estreptomicina, e plaqueadas na densidade de 3.000 células/poço (25µL) em placas de 384 poços de fundo claro com o auxílio e um dispensador Multidrop Combi (Thermo). Anteriormente à adição da suspensão celular, diferentes concentrações dos compostos testados (250 nL) foram adicionados a cada poço com o auxílio de um dispensador (Echo® *liquid handler*). A concentração máxima dos compostos testados foi de 100 µM. Em seguida, as placas foram incubadas por 48 horas a 37°C, 5% de CO₂. Após o período de incubação, as placas foram colocadas em temperatura ambiente por 30 minutos antes do procedimento de leitura. O reagente para o desenvolvimento do sinal bioluminescente, *CellTiter-Glo* (Promega), foi equilibrado em temperatura ambiente por 30 min e adicionado à placa (25 µL por poço) utilizando um equipamento Multidrop Combi (Thermo). As placas foram deixadas por 10 minutos em temperatura ambiente para estabilização e foram lidas posteriormente utilizando-se um instrumento *ViewLux* (PerkinElmer). Os resultados foram expressos em TC₅₀, correspondentes às concentrações as quais causam 50% de toxicidade nas células. Durante o ensaio de infecção, foram realizados testes de citotoxicidade em células THP-1 de acordo com Peña et al (2015).

6.4 ENSAIO INTRACELULAR DE ALTO RENDIMENTO COM FORMAS AMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA DONOVANI*

O ensaio de triagem intracelular foi realizado na farmacêutica GSK/Espanha. A ação dos 50 compostos, frente à *L. donovani*, foi determinada utilizando-se amastigotas LdBOB expressando eGFP. Os compostos foram

pré-dispensados em placas 384 poços estéreis (Greiner), utilizando um *Matrix Platemate Plus* com um sistema automatizado de pipetagem para 384 poços (250 nL em cada poço). As placas para determinação da potência dos compostos foram preparadas de acordo com De Rycker et al (2013). Cada composto foi testado em uma escala de concentração de 50 até 0.00085 μM , e em todas as placas foram incluídos um controle negativo com DMSO e um controle positivo (Anfotericina B com concentração final de 2 μM).

Células THP-1 foram diferenciadas em garrafas T-Flask de 225 cm^2 , na presença de 30 nM de PMA, a uma concentração final de 6×10^5 células/mL. Após um período de incubação de 24 horas a 37°C, 5% CO_2 , a diferenciação celular foi visualizada através do microscópio óptico. As células foram lavadas duas vezes utilizando-se meio de cultura. Em seguida, células THP-1 diferenciadas foram infectadas, nas garrafas de cultivo, com amastigotas axênicas eGFP LdBOB com um MOI (multiplicidade de infecção) de 10 (6×10^6 parasitos/mL). Cada garrafa foi incubada *overnight* e os parasitos extracelulares foram removidos através de três lavagens com tampão fosfato salino de Dulbecco estéril (DPBS). Células infectadas foram recolhidas através do tratamento com tripsina-EDTA (0.05%) durante 5 min e uma alíquota foi fixada e contada no CASY. Uma preparação celular com concentração final de 1.6×10^5 cells/mL foi realizada utilizando-se um meio RPMI (Invitrogen™) com 2% SFB (Gibco), 25 mM de bicarbonato de sódio (Invitrogen™) e 30 nM de PMA. As células infectadas foram plaqueadas nas placas de 384 poços contendo os compostos pré-dispensados (3000 células/poço, 50 μL), utilizando um dispensador de células Multidrop Combi. Anfotericina B (SigmaAldrich) foi utilizada como controle positivo e foi diluída

em uma alíquota de células infectadas para uma concentração final de 2 μ M utilizando-se um dispensador de células Multidrop Combi (Thermo). As placas foram incubadas por 96h a 37°C, 5% CO₂ e fixadas com 4% (v/v) de formaldeído em PBS por 30 min a temperatura ambiente.

Após a fixação, os poços foram lavados duas vezes com 100 μ L de PBS utilizando-se um lavador de microplacas automatizado (Bio Tek), corados com solução DAPI (4,6-Diamidino-2-fenilindol-Sigma-Aldrich) 10 μ g/mL em PBS contendo 0.1% (v/v) de Triton X-100 por 30 minutos a temperatura ambiente, e lavados duas vezes com 50 μ L de PBS. Por fim, 50 μ L de PBS foram adicionados em cada poço e as placas foram seladas e lidas em um microscópio para análises celular multiparamétrica (*High Content Screening*) (Opera QEHS), utilizando-se uma objetiva de 20x, três campos por poço. Duas imagens foram adquiridas em cada poço utilizando-se lasers de excitação de 405 nm e 488 nm.

Para esse ensaio, as imagens obtidas foram analisadas através do *software AcapellaH High Content Imaging and Analysis* (PerkinElmer), de acordo com Peña, et al (2015). Para cada poço, foi relatado o número de células THP-1, a média do número de amastigotas por macrófagos e a porcentagem de células infectadas. O cálculo do Z'factor, uma medida estatística para ensaios HTS, foi realizado de acordo com Bettiol e colaboradores (2009).

6.4.1 Critério de seleção dos compostos mais promissores contra *Leishmania donovani*

Para seleção dos compostos leishmanicida mais promissores levamos primeiramente em consideração a citotoxicidade nas células HepG2. Para essa linhagem de células foram considerados como não tóxicos os compostos que apresentaram $TC > 100 \mu\text{M}$. Dos compostos não tóxicos para HepG2, foram calculados os índices de seletividade (IS) da relação $IC_{50AM}/IC_{50HPT-1}$. Os compostos considerados como promissores aqueles que apresentaram $IS \geq 10$.

6.5 ESTUDO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO COMPOSTO LPQM-15

Os testes dos mecanismos de ação foram realizados no Laboratório de Biologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ).

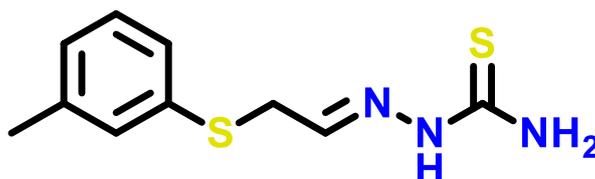
6.5.1 Efeito *in vitro* do composto LpQM 15 frente à forma promastigota de *L. chagasi*

O composto LpQM-15 (**Figura 14**) selecionado foi dissolvido em DMSO. As soluções estoques foram mantidas a -20°C e protegidas da luz até o uso. As soluções foram diluídas em meio de cultura, em diferentes concentrações de acordo com cada teste, de modo que a porcentagem de DMSO nas maiores concentrações testadas não fosse tóxica para as células (inferior a 1%).

Formas promastigotas de *L. chagasi* (1×10^6 cells/mL) foram incubadas a 26°C em meio *Schneider's* suplementado na ausência e na presença de diferentes concentrações do composto LpQM 15 (5–0,3125 μM). A densidade celular foi determinada diariamente utilizando-se uma câmara de Neubauer. A

concentração de droga que inibiu em 50% o crescimento (IC_{50}) da cultura foi estimada após 72 horas de incubação por regressão linear, através do *software* SPSS 8.0. O ensaio foi realizado em triplicata e em dois experimentos independentes.

Figura 14. Estrutura química do composto LpQM-15



P.M. 239,35

Fonte: Elaborado pela autora (2015)

6.5.2 Processamento para Microscopia Eletrônica de Transmissão

A identificação de possíveis alvos intracelulares de ação dos compostos selecionados foi realizada através da microscopia eletrônica de transmissão. Para este ensaio, promastigotas de *L. chagasi* (1×10^6), tratados ou não com os compostos selecionados, foram lavados e fixados em glutaraldeído 2,5%/paraformolaldeído 4% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) durante 2 horas a temperatura ambiente, lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em solução de tetróxido de ósmio 1%/ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio a 5 mM em tampão cacodilato 0,1 M por 1 hora. Após a fixação, os parasitos foram desidratados em concentrações crescentes de acetona (50-100%), infiltrados e incluídos em resina epóxi (Fluka Analytical, Polysciences). Cortes ultrafinos obtidos no ultramicrotomo Leica EMUC6 (Leica Microsystem,

Wetzlar, ALE) foram coletados em grades de cobre de malha 300, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo, e os cortes foram observados ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM109 a 80 kV.

6.5.3 Análises por microscopia confocal e citometria de fluxo

6.5.3.1 *Anexina e Iodeto de Propídio*

Formas promastigotas de *L. chagasi* (1×10^6 células/ mL) foram tratadas com a IC_{50} e $\frac{1}{2} IC_{50}$ por 72 horas e incubados com o *kit* para detecção de apoptose *Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit* (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Como controle positivo as células não tratadas foram incubadas na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (9%) durante 15 min a 37°C. Células não tratadas também foram avaliadas. Após o tratamento, os parasitos foram centrifugados e lavados com PBS gelado e incubados por 15 minutos a 28°C com 5 μ g/mL anexina-V-FITC (AV) e 10 μ g/mL de iodeto de propídio (IP) diluído em tampão de ligação anexina (50 mM HEPES, 700 mM NaCl, 12.5 mM $CaCl_2$). Ao final do tempo de incubação, as amostras foram ressuspensas em PBS e colocadas em microplacas (Mattek Co., USA) no momento da visualização ao microscópio confocal a laser Leica SPII AOBS (Mannheim, Alemanha). As imagens foram adquiridas usando o laser 488 nm e a emissão de fluorescência foi registrada em 510 e 560 nm para AV e IP, respectivamente.

Para análise através da citometria de fluxo, as amostras foram processadas como descrito anteriormente e colocadas em tubos apropriados

para análise no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton & Dickinson, San José, EUA), utilizando o canal FL1-H (530/30 nm) para AV-FITC e FL2-H (582/42) para IP. A intensidade de fluorescência foi adquirida em 10.000 eventos e os dados foram analisados através do *software* FlowJo 10 (©Tree Star Inc.) e expressos em porcentagem de células em cada população fenotípica (não marcadas, marcadas apenas com IP, marcadas apenas com AV ou marcada com os dois marcadores), comparadas com o número total de células analisadas. Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes.

6.5.3.2 Rodamina 123

A investigação do possível efeito dos compostos sobre a mitocôndria dos parasitos foi realizada utilizando-se o marcador Rodamina 123 para análise do potencial de membrana mitocondrial. Formas promastigotas de *L. chagasi* (1×10^6 células/mL), tratadas com a IC_{50} e $\frac{1}{2} IC_{50}$ por 72 horas, foram lavadas e ressuspendidas em 0.5 mL de PBS com 10 μ g/mL Rodamina 123 (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) por 15 minutos. Como controle foi utilizado células tratadas com metanol por 30 minutos e células não tratadas. Ao final do tempo de incubação, as amostras foram lavadas em PBS e colocadas em microplacas (Mattek Co, USA). As amostras foram visualizadas através do microscópio confocal a laser (Leica SPII AOBS) e as imagens foram adquiridas usando o laser 543 nm.

Os parasitos também foram analisados no citômetro de fluxo FACSCalibur, utilizando-se o *software* Cell Quest, no canal FL1-H. Um total de 20.000 eventos foram adquiridos na região determinada previamente, correspondendo às promastigotas de *L. chagasi*. Mudanças na intensidade de

fluorescência da Rodamina 123 foram quantificadas através do índice de variação (IV), obtido pela equação $(MT-MC) / MC$, onde MC é a média de fluorescência do controle não tratado e MT é a média das células tratadas. Os valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (ALIANÇA et al, 2014). Os ensaios foram realizados em dois experimentos independentes.

7 RESULTADOS

7.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DOS COMPOSTOS

O perfil citotoxicidade dos compostos foi inicialmente analisado em células HepG2. Dos compostos testados 43 foram considerados não tóxicos com $TC_{50} > 100 \mu M$. Tendo em vista que as células THP-1 foram as escolhidas para os ensaios de infecção com eGFP *L. donovani* e, portanto, sob forte pressão tanto da infecção como do tratamento, nos adicionalmente estimamos a atividade citotóxica dos 50 compostos também para estas células. Treze dos 50 compostos foram considerados não tóxicos para essa linhagem ($TC_{50} \geq 50 \mu M$) (**Tabela 1**). Apenas 4 dos compostos analisados não apresentaram atividade contra formas amastigotas intracelulares de *L. donovani* com $\geq 50 \mu M$ (LpQM-03, LpQM-04, LpQM-05, LpQM-07). Os demais compostos tiveram sua atividade anti-amastigota variando de 1.05-45.71 μM , para os compostos LpQM-24 e LpQM47, respectivamente (**Tabela 1**). Apesar de 46 compostos testados apresentarem atividade leishmanicida no modelo de infecção em TPH-1, vários destes compostos também foram tóxicos para células de mamífero, no caso TPH-1. Desta forma, o índice de seletividade (IS), o qual

determina o quanto uma droga é mais tóxica para o parasito do que para célula do hospedeiro, constitui também um critério a ser levado em consideração. Com base na análise do IS foram selecionados 6 compostos LpQM-15 (IS > 28.8), LpQM-16 (IS= 16.23), LpQM-17 (IS > 11.46 μ M), LpQM-18 (IS > 10.7), LpQM-19 (IS= 19.5), LpQM-21 (IS > 10.23). Embora os seis compostos selecionados apresentem-se como promissores, nós elegemos o **LpQM-15** 1-[2-(*m*-toluilitioetilideno)]tiossemicarbazona para ensaios posteriores de mecanismo de ação, por apresentar atividade frente à infecção das células TPH-1 com $IC_{50} = 1.74$. Os compostos LpQM-16 e LpQM-19, apesar de apresentarem uma excelente atividade contra *L. donovani* e IS satisfatório, acima de 10, ainda apresentaram uma citotoxicidade para TPH-1, não sendo selecionados nesta etapa do trabalho.

Tabela 1. Atividade citotóxica dos compostos em células de mamífero e sobre a infecção de células THP-1 com *Leishmania donovani*

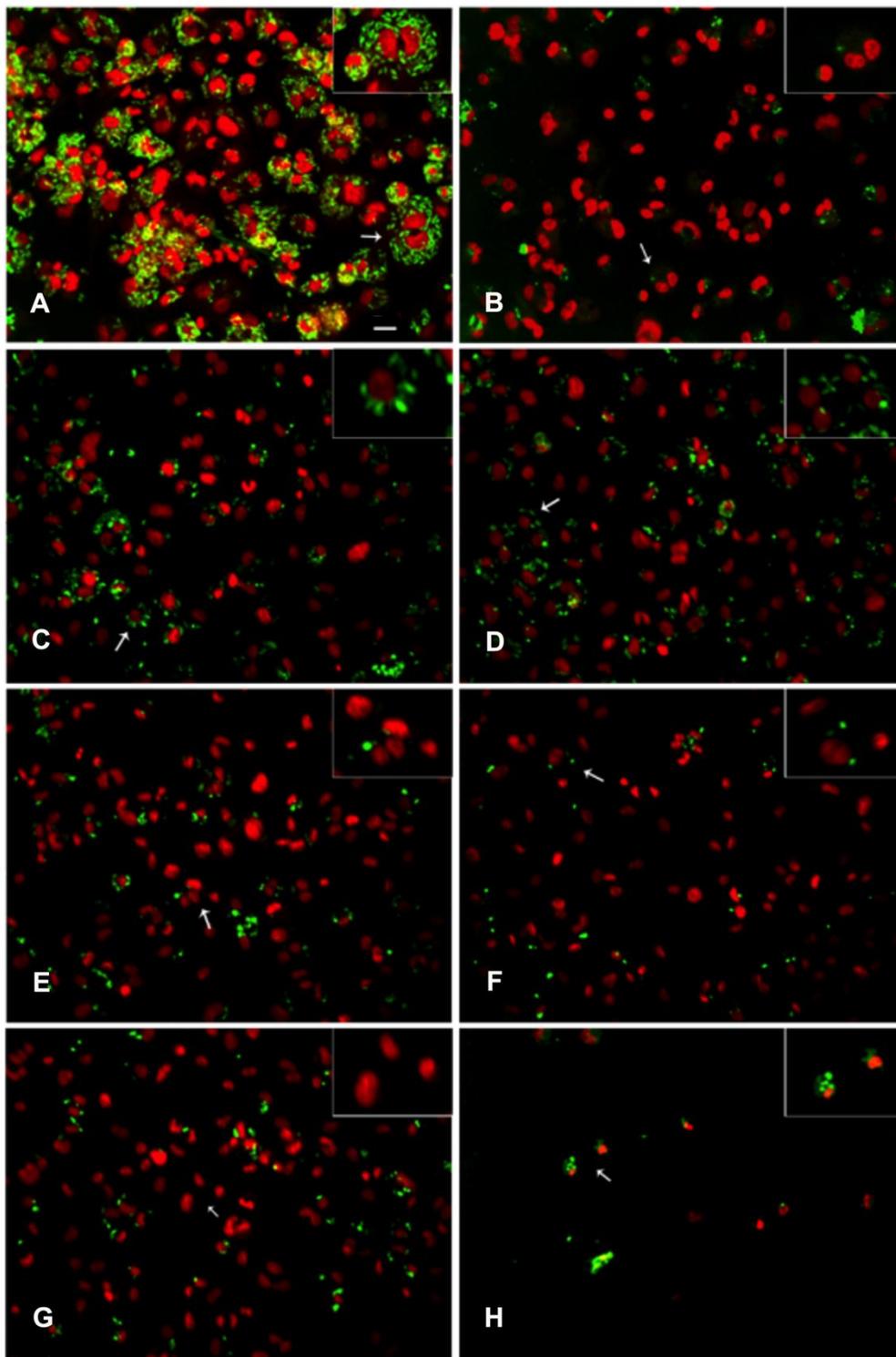
Compostos	P.M.	HepG2 TC ₅₀ (μ M)	AM/THP-1 IC ₅₀ (μ M)	THP-1 TC ₅₀ (μ M)	IS
LpQM-01	262.16	43.65	2.00	3.02	-
LpQM-02	276.19	>100	17.38	31.62	1.81
LpQM-03	406.33	>100	>50.12	>50.12	1.0
LpQM-04	392.3	>100	>50.12	10.72	0.21
LpQM-05	420.36	>100	>50.12	>50.12	1.0
LpQM-06	300.21	>100	11.75	11.48	0.97
LpQM-07	392.3	>100	>50.12	>50.12	1.0
LpQM-08	376.3	>100	19.95	31.62	1.58
LpQM-09	380.27	>100	35.48	50.12	1.41
LpQM-10	225.33	>100	11.22	>50.12	4.46
LpQM-11	243.32	>100	5.13	20.89	4.0
LpQM-12	304.22	53.70	1.26	31.62	-
LpQM-13	255.35	>100	13.80	ND	ND
LpQM-14	239.35	>100	5.13	29.51	5.75
LpQM-15	239.35	>100	1.74	>50.12	28.80
LpQM-16	239.35	>100	2.88	46.77	16.24
LpQM-17	253.38	>100	4.37	>50.12	11.46
LpQM-18	259.77	>100	4.68	>50.12	10.70
LpQM-19	259.77	>100	1.38	26.92	19.50
LpQM-20	259.77	75.86	1.38	22.39	-
LpQM-21	294.25	>100	4.90	>50.12	10.23
LpQM-22	280.08	>100	4.90	4.79	0.97
LpQM-23	294.09	>100	6.03	2.75	0.45
LpQM-24	372	>100	1.05	0.78	0.74
LpQM-25	357.99	>100	1.74	3.80	2.10
LpQM-26	298.07	18.20	4.17	8.32	-
LpQM-27	310.09	>100	4.90	6.17	1.25
LpQM-28	314.04	>100	10.23	>50.12	4.89
LpQM-29	348	>100	1.41	1.05	0.74
LpQM-30	348	>100	1.55	0.74	0.47
LpQM-31	325.06	>100	5.62	10.72	1.90
LpQM-32	325.06	>100	38.90	16.22	0.41
LpQM-33	330.09	>100	5.62	5.13	0.91
LpQM-34	294.09	91.20	2.29	0.59	-
LpQM-35	308.1	>100	1.29	0.89	0.68
LpQM-36	386.01	>100	1.66	0.91	0.54
LpQM-37	372	85.11	1.51	0.89	-
LpQM-38	312.18	91.20	1.45	0.79	-
LpQM-39	324.1	>316.23	1.62	0.98	0.60
LpQM-40	328.05	>100	1.74	0.89	0.51
LpQM-41	362.01	>100	1.55	0.91	0.58
LpQM-42	362.01	>100	1.82	1.29	0.70
LpQM-43	339.08	>100	1.62	1.29	0.79
LpQM-44	339.08	>100	19.50	1.17	0.06
LpQM-45	344.11	>100	1.32	1.23	0.93
LpQM-46	386.31	>100	31.62	50.12	1.58
LpQM-47	399.04	>100	45.71	>50.12	1.09
LpQM-48	416.33	>100	24.55	31.62	1.28
LpQM-49	479.23	>100	28.18	>50.12	1.77
LpQM-50	431.31	>100	23.44	33.88	1.44

Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Legenda: P.M. (peso molecular); HepG2 (células de hepatoma humano); TC₅₀ (concentração tóxica de 50% das células de mamíferos); AM (amastigotas); THP-1 (macrófagos); IS (índice de seletividade). Em negrito foram destacados os compostos mais promissores com IS>10.

Para medir a reprodutibilidade e qualidade do ensaio HTS, foi utilizado o *Z' factor*. Ensaio com *Z' factors* ≥ 0.5 são considerados adequados para triagens de alto rendimento (PEÑA et al, 2015). O *Z' factor* do presente estudo foi de 0.55 ± 0.07 para a atividade da relação número amastigotas/número de macrófagos e de 0.72 ± 0.03 para a % de infecção. Esses valores indicam uma boa reprodutibilidade e qualidade do ensaio.

Através do ensaio de imagem, podemos melhor evidenciar o efeito do composto LpQM-15 sobre a evolução da infecção e da citotoxicidade nas células controles e tratadas. No controle sem tratamento a infecção é evidente com um número expressivo de amastigotas expressando eGFP dentro das células THP-1 (**Figura 15 A**). Uma drástica redução da infecção é observada nas células tratadas com Anfoterina B (**Figura 15 B**), na concentração de 2 μM , bem como nos tratamentos com LpQM-15 (**Figura 15 C-H**). Na maior concentração do composto testada, no entanto, fica evidente a perda da viabilidade da célula hospedeira, evidenciada pela perda do sinal para o DAPI (**Figura 15 H**). Na concentração correspondente a aproximadamente 10 vezes a IC_{50} do composto podemos observar uma drástica redução da infecção, comparável com o tratamento com a Anfotericina B, enquanto a célula hospedeira mantém a sua integridade preservada (**Figura 15 G**).

Figura 15. Infecção de células THP-1 com *Leishmania donovani*

Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Legenda: Imagem representativa da infecção de células THP-1 evidenciadas pela marcação do DNA nuclear com DAPI (canal vermelho) infectadas por *L. donovani* expressando eGFP (canal verde, seta branca) (A) células infectadas e incubadas na presença em DMSO, (B) células infectadas e tratadas com 2 μM de Anfotericina B, (C) células infectadas e tratadas com LpQM-15 (0.068 μM); (D) células infectadas e tratadas com LpQM-15 (0.6 μM); (E) células infectadas e tratadas com LpQM-15 (1.74 μM); (F) células infectadas e tratadas com LpQM-15 (5.5 μM); (G) células infectadas e tratadas com LpQM-15 (17 μM); (H) células infectadas e tratadas com LpQM-15 (50 μM) Barra: 30 μm .

Tendo em vista os efeitos inibitórios do composto LpQM-15 sobre a infecção de células THP-1, nós partimos para avaliar os seus possíveis mecanismos de ação em *L. donovani*. Para tal testamos a atividade deste composto sobre formas promastigota. Os resultados mostraram que o composto selecionado, **LpQM-15**, foi capaz de inibir formas promastigotas de *L. chagasi* em todas as concentrações testadas (0.31- 5.0 μM) com valor de IC_{50} de $1.09 \pm 0.23 \mu\text{M}$, após 72h de incubação, quando comparadas com o controle.

7.2 EFEITOS ULTRAESTRUTURAIIS DO COMPOSTO LPQM-15 EM *L. CHAGASI*

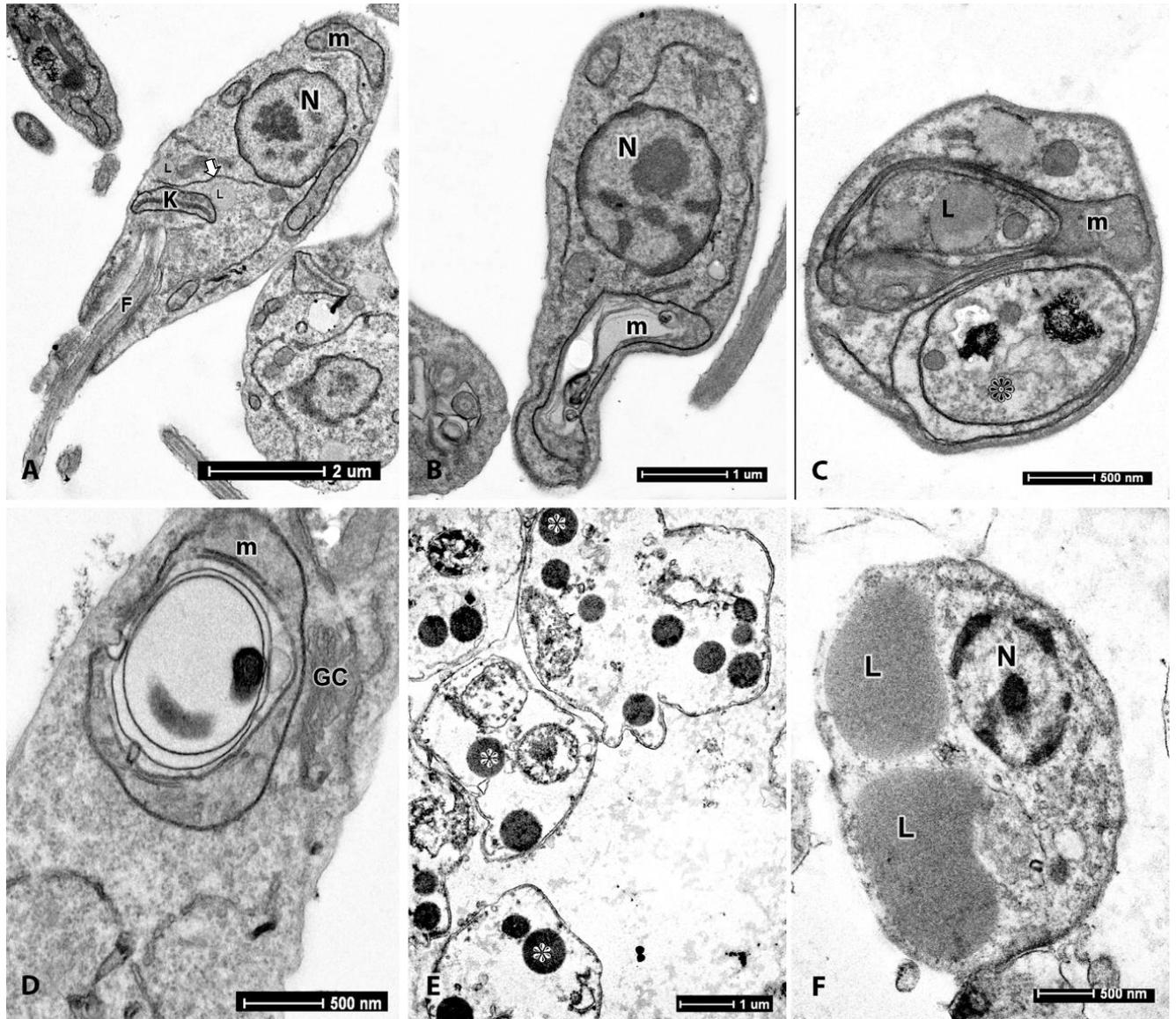
Visando avaliar os efeitos do composto **LpQM-15** em promastigotas de *L. chagasi* e identificar seus possíveis alvos intracelulares, foi realizado uma análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A figura 16-A mostra uma forma promastigota controle apresentando morfologia característica, com forma alongada, citoplasma homogêneo e flagelo. Uma única mitocôndria apresentando cristas bem definidas e k-DNA preservado também podem ser observados. O cinetoplasto é encontrado na base da bolsa flagelar, onde o flagelo emerge. O núcleo se mostra bem preservado e com nucléolo evidente. Escassos perfis de retículo endoplasmático podem ser vistos por todo o citoplasma do parasito (**Figura 16 A**).

Parasitos tratados com **LpQM-15** apresentaram drásticas alterações morfológicas em comparação com as formas promastigotas não tratadas (**Figuras 16 B-F**), até mesmo na menor concentração testadas ($\frac{1}{2} \text{IC}_{50}$). Nesta concentração, houve alterações significativas no volume mitocondrial (**Figura 16 B**), a qual apresentou inclusões lipídicas no interior de sua matriz (**Figura 16**

C), presença de perfis membranares circundando porções do citoplasma, sugestivo de autofagia (**Figura 16 C**), e perfis de membrana concêntricos (**Figuras 16 D**). Ainda na figura 16 D, observa-se um leve inchaço das cisternas do complexo de Golgi e do retículo endoplasmático.

A maioria dos parasitos tratados com a IC_{50} mostraram intensa desorganização das organelas (**Figuras 16 E-F**) e deslocamento do núcleo para a periferia (**Figuras 16 F**). Na figura 16 E é observado perda de material citoplasmático e deterioração de organelas rompidas. Em algumas células foi possível observar ruptura da membrana celular. O achado mais interessante nessas células foi a presença de uma grande quantidade de inclusões lipídicas eletrondensas distribuídas aleatoriamente em todo citoplasma (**Figuras 16 E-F**).

Figura 16. Efeito do LpQM-15 sobre a ultraestrutura de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* observado pela microscopia eletrônica de transmissão



Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Legenda: (A) Formas promastigotas controle apresentando características morfológicas preservadas e perfis de retículo endoplasmático (seta); (B-D) Células tratadas com $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ de LpQM-15; (B) Célula tratada com $\frac{1}{2} \times IC_{50}$ de LpQM-15, apresentando um aumento nos perfis de retículo endoplasmático e desorganização na mitocôndria; (C) Detalhe em maior aumento mostrando intenso inchaço da mitocôndria, formação de perfis de membranas concêntricas (m) e presença de inclusões lipídicas (L) no interior da matriz mitocondrial; (D) Célula apresentando leve inchaço das cisternas do complexo de Golgi (CG) e do retículo endoplasmático; (E) Células tratadas com IC_{50} de LpQM-15, mostrando drásticos efeitos morfológicos com perda de material citoplasmático, aumento no número e na eletrondensidade das inclusões lipídicas no citoplasma (asterisco branco). (F) Detalhe da célula tratada com IC_{50} de LpQM-15 mostrando grandes inclusões lipídicas no citoplasma (L). (CG) Complexo de Golgi; (F) Flagelo; (k) Cinetoplasto; (L) Lipídio (M) Mitocôndria; (N) Núcleo.

7.3 EFEITO DO COMPOSTO LPQM-15 SOBRE O POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL ($\Delta\Psi_M$)

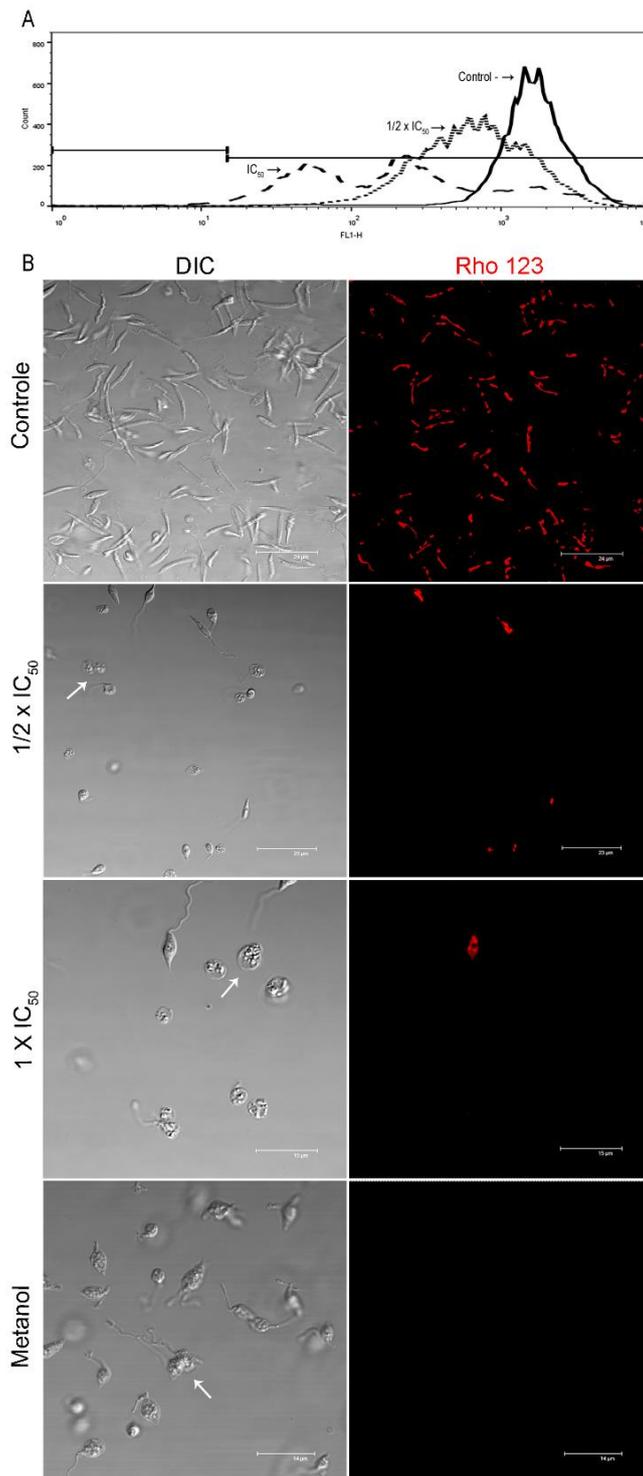
As análises ultraestruturais sugeriram a mitocôndria do parasito como o principal alvo intracelular do **LPQM-15**. A partir dessas informações foi investigado se o tratamento com o **LPQM-15** afetaria o potencial de membrana da mitocôndria ($\Delta\psi_m$), utilizando a Rodamina 123 (Rho 123) como marcador fluorescente. Esse corante catiônico permeia as membranas celulares, sendo utilizado para marcar mitocôndrias em células viáveis.

As análises através da citometria de fluxo das amostras tratadas mostraram uma diminuição da marcação com a Rho 123 quando comparadas às células controles, indicando uma forte despolarização da membrana mitocondrial nas duas concentrações testadas (**Figura 17 A**). O composto **LpQM-15** causou drástico efeito no potencial de membrana dos parasitos, mostrado através dos os valores negativos dos índices de variação (IV) de -0.6 e -0.8 no tratamento com a $\frac{1}{2}$ IC₅₀ (0.55 μ M) e IC₅₀ (1.09 μ M), respectivamente, quando comparados ao controle negativo (**Tabela 2**).

As células também foram analisadas através de microscopia confocal, permitindo acompanhar com detalhes as alterações ocorridas durante o tratamento com o composto. As imagens da microscopia confocal dos parasitos tratados e controles corroboram os dados da citometria de fluxo, evidenciando a perda da intensidade da marcação com Rho 123 nas células morfológicamente alteradas. A sobreposição das imagens de contraste de interferência diferencial (DIC) revela o arredondamento do corpo celular e a

perda do flagelo das promastigotas tratadas com metanol e LpQM-15 nas duas concentrações testadas (**Figure 17 B**).

Figure 17. Efeitos do LPQM-15 no potencial de membrana mitocondrial de promastigotas de *Leishmania chagasi*



Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Legenda: (A) Sobreposição dos histogramas da citometria de fluxo de parasitos controles e tratados com LpQM-15 e marcados com Rho 123. A redução da intensidade da fluorescência da Rho 123, principalmente nos parasitos tratados com a IC_{50} de LPQM-15, indica a despolarização da membrana mitocondrial. (B) Microscopia confocal de células controles e tratadas com LpQM-15 e metanol, submetidas a marcação com Rho 123. Células controles apresentaram morfologia e intensidade de marcação com Rho 123 preservadas. Note nas células tratadas a presença de alterações morfológicas (setas) e ausência da marcação com Rho 123. **DIC** – sobreposição das imagens de contraste de interferência diferencial (*Differential Interference Contrast*). Barra: 24 μm .

Tabela 2. Análise da citometria de fluxo de *Leishmania chagasi* tratada com LpQM-15 e marcada com Rodamina 123.

LPQM-15 (μM)	Mediana	IV*
0.0	1640	0.0
0.5	637.8	-0.6
1.0	199.89	-0.8

Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Legenda: *IV= (MT – MC) /MC, onde MT corresponde a mediana da fluorescência para parasitos tratados e MC aos parasitos controles.

7.4 ANÁLISE DA VIABILIDADE CELULAR INDUZIDA PELO LPQM-15 SOBRE *LEISHMANIA CHAGASI*

Para análises do mecanismo de morte celular disparado pelo **LpQM-15** em *Leishmania chagasi*, células tratadas e controles foram submetidas à marcação com o Anexina V e Iodeto de propídio (AV/IP), marcadores utilizados para distinguir células apoptóticas de células necróticas, respectivamente. Anexina V é uma proteína de ligação para fosfolipídios dependente de Ca^{2+} , possuindo alta afinidade para a fosfatidilserina, enquanto que o IP é um marcador fluorescente que se liga ao DNA da célula quando existe a perda da permeabilidade seletiva da membrana plasmática (SANDES et al, 2014).

Nos estudos de microscopia confocal, formas promastigotas controles não tratados não mostraram marcação com nenhuma das sondas fluorescentes e apresentaram morfologia preservada, indicando a viabilidade dessas células com sua membrana plasmática íntegra.

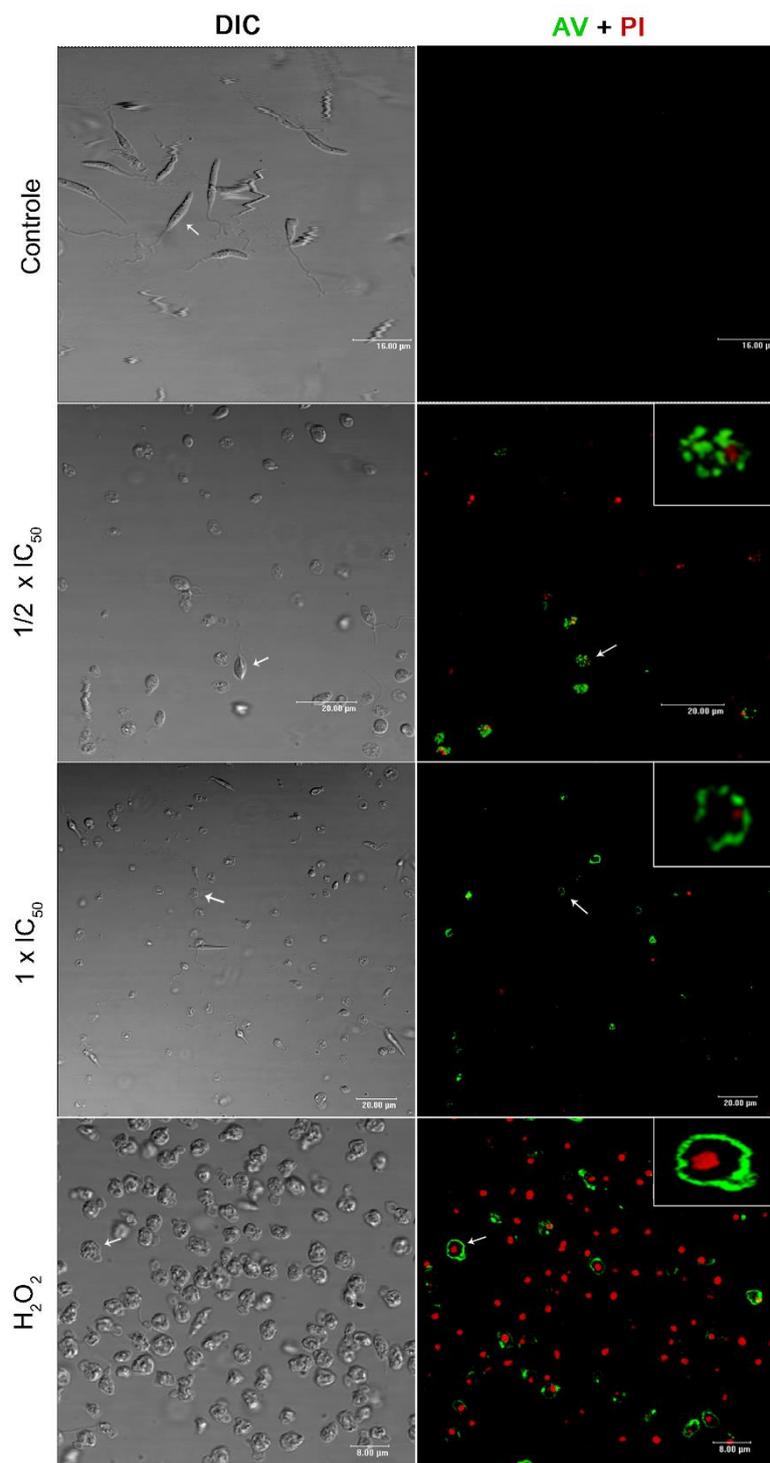
As células tratadas com o **LpQM-15** demonstraram marcação com AV na $\frac{1}{2}$ IC_{50} (0.55 μM) e IC_{50} (1.09 μM), embora algumas células tenham apresentado marcação duplo positiva e drásticas alterações morfológicas, observadas através do Contraste de Interferência Diferencial (DIC). Já células incubadas com peróxido de hidrogênio, controle positivo, apresentaram-se

marcadas com AV/IP e com alterações morfológicas, como arredondamento do corpo celular e perda de flagelo (**Figura 18**).

Os resultados da microscopia confocal foram corroborados pela citometria de fluxo. Como esperado, células na ausência das sondas fluorescentes não apresentaram marcação, excluindo-se a possibilidade de autofluorescência (**Figura 19 A**). Da mesma forma, células controles sem tratamento e marcadas com as sondas apresentaram fenótipo predominante AV negativo e IP negativo. Por outro lado, 74,3% das células tratadas com peróxido de hidrogênio, utilizadas como controle de morte celular, apresentavam-se duplo marcadas.

A figura 19 representa os gráficos em *dot plots* relativos a marcação das células com AV/IP. A figura 19 A representa o controle negativo não marcado com as sondas. Como esperado, as células controles apresentaram fraca marcação com AV/IP com aproximadamente 97,3% das células não marcadas (**Figura 19 B**), enquanto as células incubadas com H₂O₂ apresentaram duplo marcação correspondendo a 74,3% da população de parasitos (**Figura 19 C**). A população tratada com a ½ IC₅₀ apresentou 8,86% de marcação com anexina V e 3,31% dupla marcação (**Figura 19 D**), enquanto a população tratada com IC₅₀ demonstrou 29,1% de marcação com anexina V e 6,47% dupla marcação (**Figura 19 E**). Adicionalmente, esses dados foram confirmados através da análise estatística, mostrando a alta significância do percentual de marcação com AV (**Figura 19 F**).

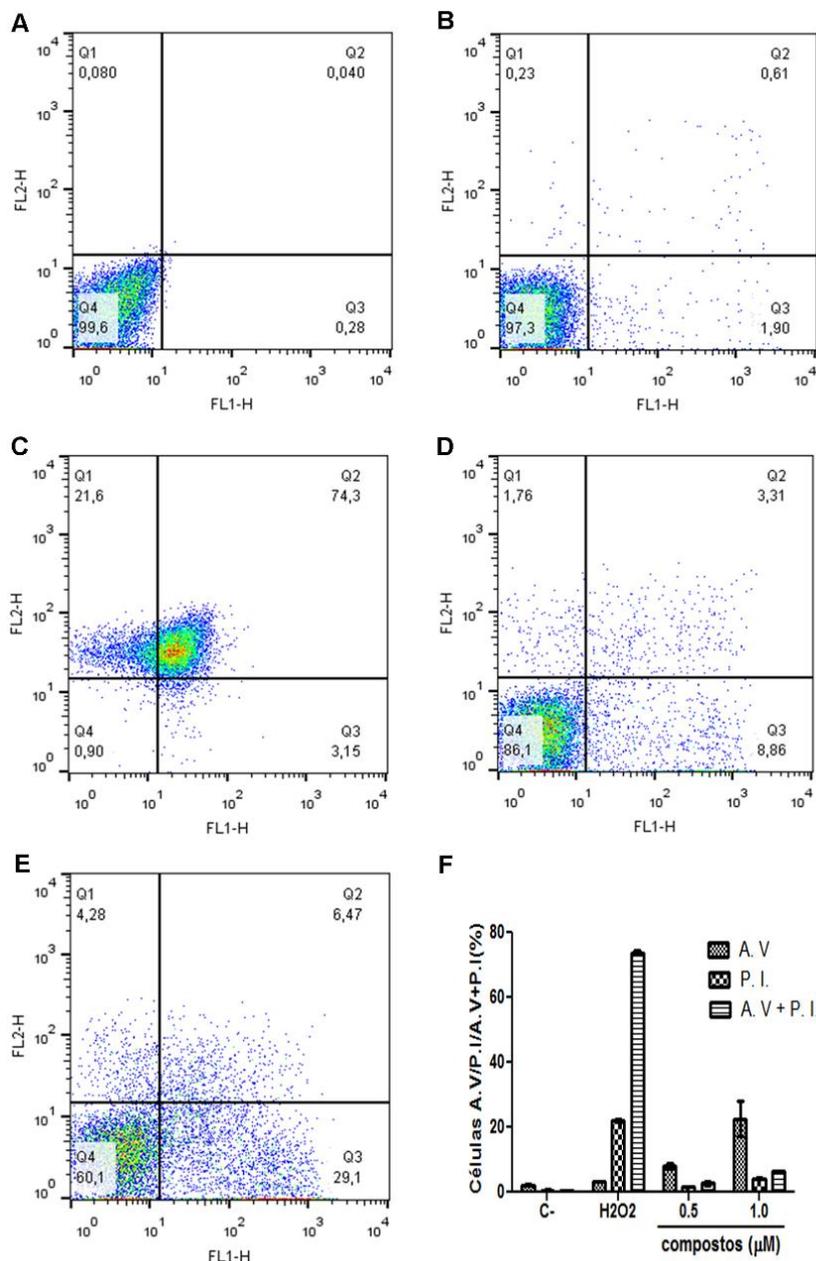
Figura 18. Marcação da Anexina V/PI em formas promastigotas *Leishmania chagasi* tratadas com LPQM-15



Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Legenda: Microscopia confocal de células controles e tratadas com LpQM-15 e H₂O₂ (peróxido de hidrogênio), submetidas a marcação com AV/PI. Células controles sem tratamento. Observe a presença de células com marcação positiva para AV nas concentrações 1/2 IC₅₀ e IC₅₀ de LPQM-15 (setas). Alterações morfológicas podem ser observadas pelo contraste de interferência diferencial (DIC, coluna da esquerda) no tratamento com 1/2 IC₅₀ e IC₅₀ de LPQM-15 (setas). **AV + PI**, imagens obtidas no canal correspondente a fluorescência do anexina V/iodeto de propídio; **DIC** – sobreposição das imagens de contraste de interferência diferencial (*Differential Interference Contrast*).

Figura 19. Gráficos em *dot plots* das análises de citometria de fluxo de formas promastigotas de *Leishmania chagasi* marcadas com Anexina V/ Iodeto de Propídio



Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Legenda: Promastigotas tratadas com o composto LpQM-15 por 72 horas e marcadas com anexina/PI. Gráficos em *dot plots* das análises de citometria de fluxo mostrando controle negativo não marcado com as sondas (A), controle sem tratamento (B), controle tratado com H₂O₂ (C) e células tratadas com 1/2 IC₅₀ e IC₅₀ de LPQM-15, respectivamente (D– E) marcadas com anexina V/PI. (F) Análise quantitativa dos parasitos positivos apenas para anexina V. A porcentagem de células representa no quadrante inferior esquerdo, duplo negativo; superior esquerdo, positivo para PI; inferior direito, positivo para anexina V; superior direito duplo positivo para anexina V e PI. Os valores foram obtidos de duas leituras de dois experimentos independentes e os *dot plots* representam resultados similares. (C-) controle negativo. (H₂O₂-) controle positivo *Comparados ao controle negativo (ANOVA *two-way*, seguido do pós-teste de Bonferroni, $p < 0.0001$).

8 DISCUSSÃO

No presente estudo, realizamos uma triagem de 50 hidrazonas frente a formas amastigotas de *L. donovani* expressando eGFP, através do HTS, além de avaliarmos o perfil citotóxico dessas moléculas em uma linhagem de hepatócitos (HepG2) e uma linhagem de origem leucocitária monocítica (THP-1). As células HepG2 são utilizadas como um dos principais modelos experimentais para estudos de citotoxicidade *in vitro*, porque apresentam origem humana, são de fácil manipulação e exibem uma variedade de respostas a diferentes drogas. Essas características permitem elucidar o mecanismo de ação tóxica das substâncias em estudo (BETTIOL et al, 2009; SUN et al, 2012). Por outro lado, as células THP-1 tem sido utilizadas com sucesso nas avaliações de citotoxicidade de compostos com potencial leishmanicida e tripanocida (KIEFFER et al, 2015) bem como nos ensaios de infecção com tripanossomatídeos (KANELLOPOULOS et al, 2014).

Nossos resultados demonstraram que 43 dos 50 compostos foram considerados não tóxicos para células HepG2. Quando avaliamos os mesmos compostos sobre células THP-1, observamos que esta linhagem é mais sensível do que a HepG2 com apenas 13 compostos apresentando citotoxicidade > 50 uM. Todos os compostos considerados não tóxicos para THP-1 também não apresentaram citotoxicidade para HepG2. A maior resistência observada na linhagem HepG2 pode ser explicada pelo fato destas células serem derivadas de hepatócitos, células que desempenham um papel importante na detoxificação do organismo, possuindo um grande arsenal enzimático para realizar essa função (GODOY et al, 2013).

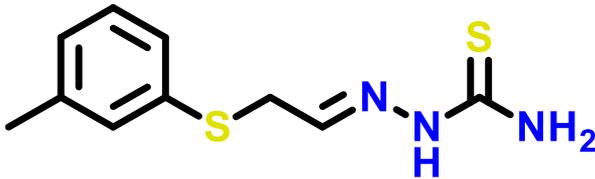
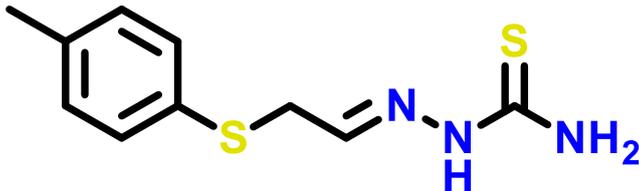
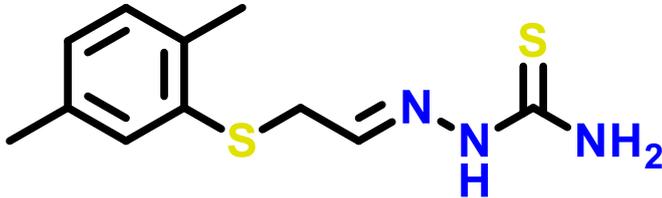
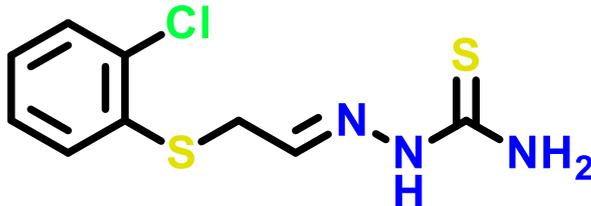
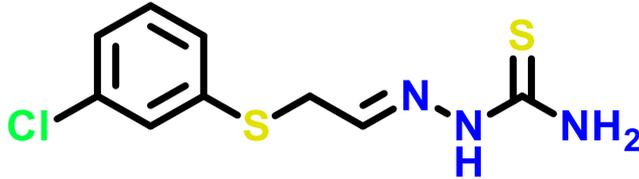
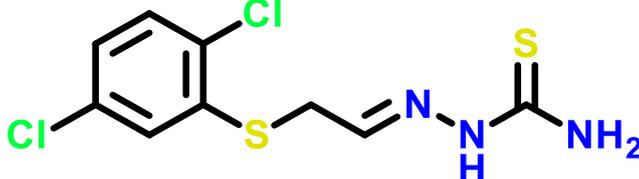
A partir do ensaio de citotoxicidade, realizamos a avaliação dos efeitos dos compostos sobre a evolução da infecção das células THP-1 por *L. donovani*, através da triagem associada a imagens de microscopia confocal. A partir dos IS obtidos, foram selecionados seis compostos. Interessantemente, todos estes compostos pertencem a classe química tiossemicarbazonas, possuindo como grupamentos substituintes o metil e o cloro (**Tabela 3**). Outra característica dessas moléculas é a presença de dois determinantes estruturais e a presença de um grupo espaçador entre o grupo aril e o grupo tiossemicarbazona. Esta configuração molecular tem conferido uma atividade anti-*T. cruzi* aumentada quando comparada com seus análogos sem o grupo espaçador (MOREIRA et al, 2014). É possível que a presença destes espaçadores confira também uma maior atividade destas moléculas sobre *L. donovani*.

Britta e colaboradores (2012) avaliaram a atividade de um composto dessa mesma classe, frente amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, obtendo valores de IC₅₀ de 10,7 µM. Adicionalmente, em promastigotas, a atividade dessa tiossemicarbazona também foi inferior com IC₅₀ de 3,8 µM. Um estudo recente também avaliou outra tiossemicarbazona, frente a formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, obtendo um IS de 11.5 e reforçando que essa classe de compostos possui uma maior especificidade para o parasito do que para células do hospedeiro.

Carvalho e colaboradores (2014) investigaram a atividade tripanocida de tiossemicarbazonas e derivados, evidenciando que essas moléculas também reduziram potencialmente a infecção e eliminaram parasitos intracelulares a 1µM, sem efeitos tóxicos para as células hospedeiras, considerando a classe

tiossemicarbazona como promissora para testes *in vivo*. Ainda, através da investigação dos possíveis mecanismos de ação dessas drogas, esse estudo ressalta que as tiossemicarbazonas controlam de maneira eficiente a multiplicação de amastigotas intracelulares (CARVALHO et al, 2014).

Tabela 3. Tiossemicarbazonas selecionadas no ensaio intracelular em *L. donovani*

Composto	Estrutura	Subs.	P.M.
LpQM-15		3-Me	239,35
LpQM-16		4-Me	239,35
LpQM-17		2,5-Me	253,38
LpQM-18		2-Cl	259,77
LpQM-19		3-Cl	259,77
LpQM-21		2,5-Cl	294,25

Fonte: Elaborado pela autora (2015)

Em nossos ensaios, selecionamos o composto LpQM-15, que apresentou o melhor IS e baixa citotoxicidade para as células HepG2 e THP-1, para dar seguimento aos estudos de mecanismo de ação. Para tal, a espécie *L. chagasi* foi selecionada, uma vez que é o agente causador da leishmaniose visceral no continente americano e, portanto, de maior relevância para saúde pública em nosso país. A análise ultraestrutural das células tratadas com este composto mostrou drásticas alterações no parasito, principalmente na mitocôndria, sugerindo que esta organela seja o alvo primário de ação do LpQM-15. Alterações morfofisiológicas na mitocôndria de *L. amazonensis* foram relatadas em estudos com tiossemicarbazonas derivadas do limoneno (Britta et al, 2012).

Para avaliarmos se as alterações nas mitocôndrias se traduziriam fisiologicamente na perda do potencial de membrana desta organela, utilizamos a Rodamina 123, um corante catiônico fluorescente que é permeável às membranas celulares e que são rapidamente sequestrados por mitocôndrias ativas (DARZYNKIEWICZ; STAIANO-COICO; MELAMED, 1981). A integridade e a função das mitocôndrias são mantidas por um potencial eletroquímico. Alterações neste potencial podem levar a diminuição de ATP com consequente redução na transcrição e tradução de genes mitocondriais, resultando em morte celular por apoptose ou necrose (SHANG et al, 2009). Os valores mostrados para o índice de variação (IV) nas células tratadas indicam a despolarização da membrana plasmática e perda deste potencial. Esses eventos podem ativar proteases dos parasitos que iniciam a via apoptótica, resultando em danos ao DNA e morte (PALIT et al, 2012). Nossos dados demonstram que as alterações morfofisiológicas observadas nas mitocôndrias,

tanto por microscopia eletrônica de transmissão quanto por citometria e microscopia confocal precede a morte do parasito.

Para verificarmos se as alterações mitocondriais estavam levando a morte do parasito, nós utilizamos o *kit* de viabilidade celular, baseado no uso da Anexina V e iodeto de propídio, que permite discriminar a morte celular por apoptose ou necrose. Nossos resultados, tanto da microscopia confocal quanto de citometria corroboram os dados obtidos através de microscopia eletrônica, mostrando que o tratamento com a droga leva um aumento substancial na morte celular do parasito de maneira dose-dependente. No entanto, devido ao seu caráter estático da MET, a discriminação do tipo de morte celular não fica tão evidente por esta técnica.

Na concentração correspondente a $\frac{1}{2}IC_{50}$ do composto, observa-se aumento nos perfis de retículo endoplasmático e a presença de estruturas semelhantes à autofagosoma, sugestivo de autofagia (SANDES et al., 2010). Sabe-se que os processos de morte celular são dinâmicos e envolvem diferentes etapas que, em algum momento, podem se sobrepor nas células (SANDES et al., 2010). Assim, em concentrações mais baixas a autofagia poderia ser o mecanismo disparado para tentar subverter o efeito deletério da droga. Isso talvez explique uma proporção expressiva da população (86 %) negativa tanto para AV quanto para PI, observado nos ensaios da citometria. Estudos tem demonstrado a presença de autofagia em tripanossomatídeos submetidos ao tratamento com drogas (SANDES et al., 2010; BRITTA et al, 2014). Já nas maiores concentrações, na impossibilidade das células em reverter os danos celulares, o parasito evoluiria rapidamente para apoptose/necrose. Nossos resultados da citometria e as imagens obtidas

através de microscopia confocal sugerem que a apoptose é preponderante nas células tratadas com IC₅₀ de LpQM-15, embora a necrose também possa estar ocorrendo. Estudos com séries semelhantes de tiossemicarbazonas tem mostrado que estas moléculas são capazes de induzir a apoptose em *T. cruzi* e *Leishmania*.

Além das alterações na mitocôndria, nossas análises ultraestruturais demonstraram a presença, nos parasitos tratados, de grande acúmulo de inclusões lipídicas tanto no citoplasma quanto na matriz da mitocôndria. A presença destas estruturas intracelulares pode indicar possíveis alterações no metabolismo dos fosfolípidios e esterol (BRITTA et al, 2014). Consistente com essa ideia, estudos demonstraram que inibidores de ergosterol e outras drogas que sabidamente alteram o metabolismo de lipídios de alguma forma produzem danos as mitocôndrias de vários parasitos incluindo *Leishmania*, como os observados em nosso estudo (VANNIER-SANTOS; DE CASTRO, 2009).

Concluindo, nosso estudo mostrou que a atividade do LpQM-15 frente à *Leishmania sp.* pode estar envolvida com diversos mecanismos de ação na célula, como alterações na mitocôndria e no metabolismo de lipídeos, e ainda que essas vias podem se sobrepor. Além disso, esse composto se mostrou um candidato a fármaco leishmanicida, uma vez que sua atividade foi promissora, sem causar toxicidade às células hospedeiras de mamíferos.

CAPÍTULO II

Avaliação Farmacológica de Novas Hidrazonas Candidatas a Fármacos Tripanocida

9 RESULTADOS

9.1 ARTIGO (SUBMETIDO À CHEMMEDCHEM EM 08/2015)

Compound Profiling and 3D-QSAR Studies of Hydrazone Derivatives with Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi*

Lívia Bandeira Costa^a, Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso^a, Gevânio Bezerra de Oliveira Filho^a, Paulo André Teixeira de Moraes Gomes^a, José Wanderlan Pontes Espíndola^a, Pedro Henrique Monteiro Torres^b, Floriano Paes Silva Junior^b, Julio Martin^d, Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo^c and Ana Cristina Lima Leite^{a,*}

^a*Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, PE, Brazil.*

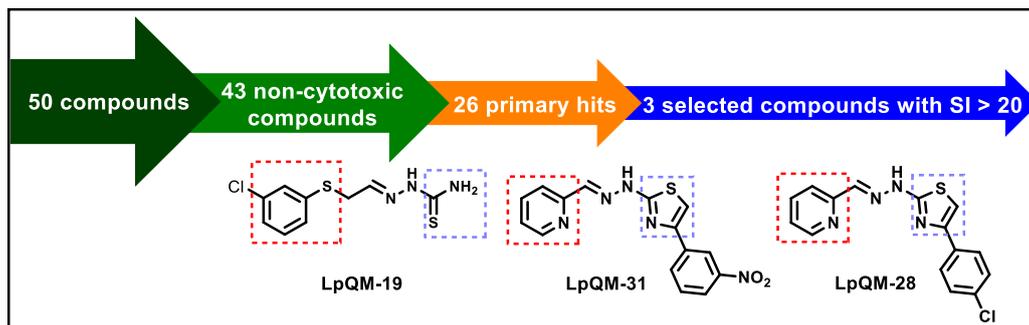
^b*Laboratório de Bioquímica de Proteínas e Peptídeos, Fundação Oswaldo Cruz, 21040-900 - Rio de Janeiro, RJ – Brasil*

^c*Departamento de Microbiologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, PE, Brazil.*

^d*Molecular Discovery Research, Tres Cantos Medicines Development Campus, GlaxoSmithKline, Tres Cantos - Spain*

** Corresponding author*

E-mail address: acllb2003@yahoo.com.br

Table of contents

The Search for a new anti. *T. cruzi* agent is a challenge for the modern medicinal chemistry. Past more than 40 years, no new drug was launched. This study aims at finding a new trypanocidal drug more selective and less cytotoxic than benznidazole, the standard drug for Chagas disease treatment.

Abstract

Chagas disease is a tropical disease caused by the parasite *Trypanosoma cruzi*, which is endemic in Central and South America. Few treatments are available with effectiveness limited to the early (acute) stage of disease, significant toxicity and widespread drug resistance. In this work we report the outcome of a HTS compatible chemical library screen to identify novel, nontoxic, small-molecule inhibitors of *T. cruzi*. We have selected 50 compounds that possess hydrazone as a common group. The compounds were screened using recombinant *T. cruzi* (Tulahuen strain) expressing beta-galactosidase. A 3D quantitative structure–activity relationship (QSAR) analysis was performed using descriptors calculated from comparative molecular field analysis (CoMFA). Our findings show that of the fifty selected hydrazones, compounds **LpQM-19**, **28** and **31** displayed the highest activity against *T. cruzi*, leading to a selectivity index (SI) of 20-fold. The 3D-QSAR analysis indicates that a particular electrostatic arrangement, where electron-deficient atoms are aligned along the molecule main axis positively correlates with compound biological activity. These results provide new candidate molecules for the development of treatments against Chagas disease.

Key words: Chagas disease, Hydrazones, Thiosemicarbazones, Thiazoles, 3D-QSAR, Drug design.

1. Introduction

Chagas disease, or American trypanosomiasis, is a devastating neglected disease with no satisfactory treatment[1]. Currently, the World Health Organization estimates that 8-10 million people are infected with *T. cruzi*, the aetiological agent of this illness[2,3]. Benznidazole and nifurtimox are the two drugs available for the treatment of Chagas disease. These archaic drugs are associated with severe side effects that cause discontinuation of treatment and limit their long-standing use. Furthermore, their efficacy in the chronic phase of the disease is still controversial, and drug-resistant strains have been observed [4,5]. Hence, the discovery of non-toxic and more effective drugs to combat *T. cruzi* is urgently needed[3,5]. However, the research for new drugs against many neglected diseases, such as Chagas disease, has faced several drawbacks in drug discovery programs, such as the complex biology of parasites and different life cycle stages[4].

High-throughput screening (HTS) is an important tool that allows drug discovery through the identification of active compounds (hits) from a large number of candidates[6,7]. HTS assays have been restricted to pharmaceutical companies due to the high costs associated with the drug screening experiments. However, with the increasing interest in the development of new platforms for drug prospection, this method has become more accessible and thus has also been used in academic research[8].

In recent years, there have been significant advances in automated microscopy that enable the testing of compounds against intracellular parasites in high-throughput mode[9–11]. Since the advent of the “classical” screening assay for *T. cruzi* based on absorbance readout developed by Fred Buckner and collaborators and used by numerous laboratories on a small scale, advances have been made in terms of the HTS format[12].

The Chagas disease drug discovery efforts have been facilitated by the development of recombinant *T. cruzi* parasites used as tools for drug screening[13]. A *T. cruzi* strain expressing the β -galactosidase reporter gene (β -gal) was the first to allow the use of automated phenotypic assays *in vitro* for drug screening against *T. cruzi*[14,15]. The β -gal *T. cruzi* strain allows detection of parasite growth through the measurement of the β -gal activity, which is correlated with the number of viable parasites[7].

Regarding the identification of new anti-*T. cruzi* agents, most of the efforts have been conducted through the investigation of peptides and peptide-like compounds containing functional groups such as urea[5,16], hydrazones[17–20], triazoles[21,22] and thiosemicarbazones[23–26]. Caputo et al (2012) demonstrated the trypanocidal activity for a series of 4- arylthiazolylhydrazones[27] with broad and potent activity against all forms of the parasite. Our efforts towards new antichagasic drugs since 2010 have led us to synthesize a variety of thiosemicarbazones, thiazolyl hydrazones and 2-iminothiazolidin-4-ones as trypanocidal agents[28–31].

In the present work, we screened a small chemical library of fifty compounds belonging to the hydrazone chemical class (thiosemicarbazones, thiazolinone and thiazole) through a cell-based assay for HTS using a *T. cruzi* β -gal strain, according to Peña et al (2015)[32]. Herein, we report three major compounds that inhibited the development of intracellular *T. cruzi* amastigotes in a micromolar range and had low toxicity effects on mammalian cells. In addition, we investigated the structural and chemical features related to the biological activity of these compounds through a 3D QSAR analysis.

2. Methods

2.1. Compound Library

Taking into account the bioisosteric relationship between thiosemicarbazones, thiazoles and thiazolidin-4-ones, 50 compounds possessing a hydrazone moiety were synthesized. Among these compounds, only compounds (**LpQM-22-45**) were previously reported in literature[31], therefore the chemical characterization of the new compounds (**LpQM-01-21**, **LpQM-46-50**) is reported in supplementary material. This chemical library comprises four sub-series, which possess some specific structural features. 1-(3,4-dichlorophenyl)ethylidene)-4-phenylthiosemicarbazones (**LpQM-01-02**) (unpublished data) underwent a cyclization reaction to form derivatives 2-[1-(3,4-dichlorophenyl)ethylidenohydrazone]-3-phenyl-5-isopropyl-thiazolidin-4-one (**LpQM-03-05**) (unpublished data) and 2-[1-(3,4-dichlorophenyl)ethylidene-hydrazinyl]-4-methyl-1,3-thiazol (**LpQM-06-09**) (unpublished data). Our research group has developed the synthesis of thiophenol-2-ylidene-thiosemicarbazones (**LpQM-10-21**) (unpublished data), pyridyl-arylidene-thiazoles (**LpQM-22-45**)[31] and *m*-bromophenyl-methylidene-thiazoles (**LpQM-46-50**) (unpublished data) (**Figure 1**). All of the

compounds were chemically characterized by infrared (IR), nuclear magnetic resonance (^1H , ^{13}C NMR), elemental analysis (EA) and mass spectral (MS) studies. Elemental analysis was performed to confirm the degree of purity (> 95 %).

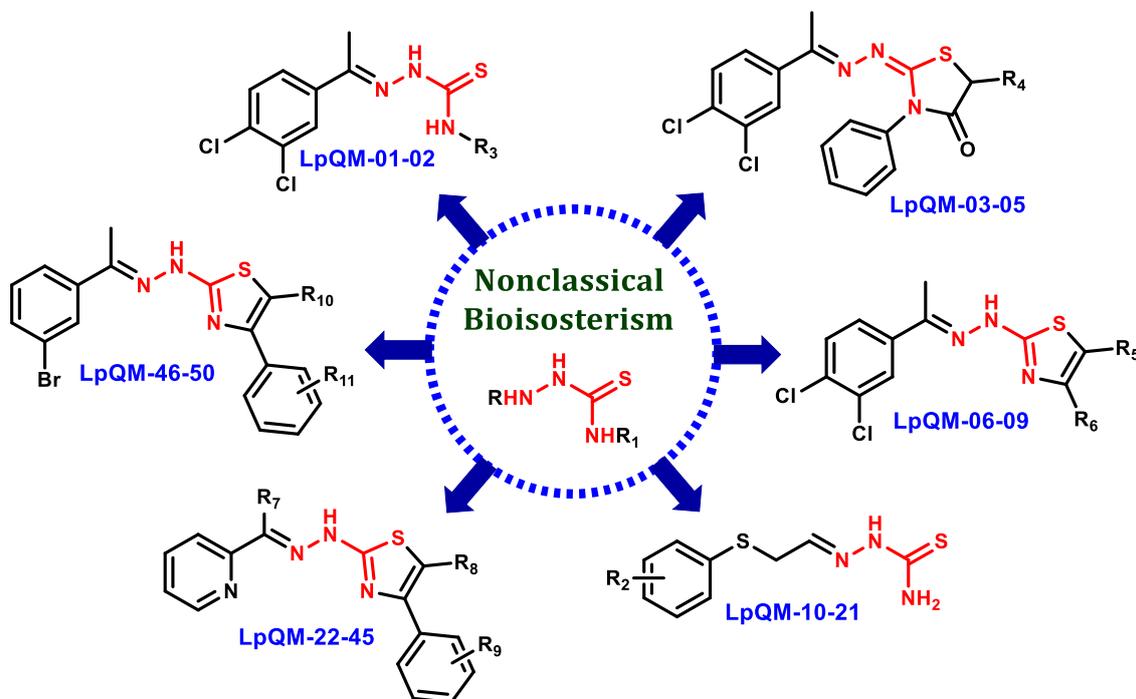


Figure 1: Compound Library tested (the complete structure of compounds is presented in **Table S1**)

2.2. Parasites and Cell Lines Cultures

LLC-MK2 cells (green monkey kidney epithelial cells) were purchased from the European Cell Cultures Collection (ECACC reference 85062804). NIH-3T3 cells (mouse embryonic fibroblast cell line) were provided by the GSK-Biological Reagents and Assay Development Department (BRAD, Stevenage, UK). *T. cruzi* parasites of Tulahuen strain, expressing β -galactosidase as an intracellular reporter, were kindly provided by Dr. Buckner[33] (University of Washington, Seattle, USA). The parasites were maintained in culture by weekly infection of LLC-MK2 cells. Trypomastigote forms were obtained from the supernatants of LLC-MK2 infected cultures harvested 5 and 9 days post-infection. HepG2 cells (human hepatoma) were provided by the GSK-Biological Reagents and Assay Development Department (BRAD, Stevenage, UK). All cell lines were cultivated according to Peña et al (2015)[32].

2.3. Anti- *Trypanosoma cruzi* Activity

The HTS assay and data analysis were performed according to GSK standard operating procedures[32]. To measure the reproducibility and quality of the HTS assay, we used the Z' factor[7,8]. Assays with Z factors ≥ 0.5 are considered appropriate for HTS. Our assay Z factor was 0.75, indicating that it is highly robust. The assay was performed in 1,536-well surface-treated tissue culture plates at different concentrations ranging from 50 to 0.00085 μM in each compound/well, diluted in DMSO. The percentage of DMSO in the experiments never exceeded 0.5%, which is non-toxic for both cells and parasites. To evaluate the growth inhibition of intracellular amastigotes of *T. cruzi*, a recombinant *T. cruzi* strain expressing β -galactosidase was used to infect NIH-3T3 cells. A mixed culture of NIH-3T3 and parasites at a final concentration of 1×10^3 cells/well (1:1 parasites/NIH-3T3 cells) was seeded in a 1,536-well culture plate containing pre-dispensed tested compounds. The plates were incubated for four days at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere. The substrate used for the fluorescence intensity (FLINT) readout was resorufin- β -D-galactopyranoside (Sigma-Aldrich) diluted at 5 μM /well in PBS supplemented with the soft detergent Igepal (Fluka). The plates were incubated for 4 h at room temperature, and the fluorescent signal was read using an EnVision microtitre plate reader (Perkin-Elmer) at excitation/emission wavelengths of 531/595 nm. Untreated parasites were used as negative controls. The criteria for compound selection in the *T. cruzi* assay were: a) $\text{pIC}_{50} > 5$ for *T. cruzi*; b) $\text{pIC}_{50} < 5$ for both mammalian cell lines; and c) a selectivity index > 10 . The selectivity index (SI) was determined as the ratio of IC_{50} HepG2/ IC_{50} parasite.

2.4. Mammalian cell cytotoxicity assay

For the NIH-3T3 cytotoxicity assay, the cell culture (1×10^3 cells/well) was seeded in surface-treated culture plates (1,536 well) containing pre-dispensed compounds at a maximum concentration of 100 μM . Cells treated with 0.5% DMSO were used as a negative control (100% viable cells) while cells treated with Amphotericin B at 50 μM were considered a positive control, where the cell toxicity is maximum, i.e., 100%. Plates were incubated for 4 days at 37 °C and 5% CO_2 . The HepG2 cytotoxicity assay was performed according Peña et al (2015)[32]. A HepG2 (3,000 cells/well) culture was

plated into 384-well clear-bottom plates containing pre-dispensed test compounds, as described for the NIH-3T3 assay. Plates were incubated for 48 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. After incubation, to determine the number of viable cells in culture based on quantitation of ATP present, both NIH-3T3 and HepG2 plates were incubated at room temperature with 5 µL CellTiter-Glo® Reagent (Promega), following the manufacturer's instructions. Luminiscence was measured using a ViewLux microplate reader. The 50% toxic concentration (TC₅₀) was determined by the Activity-Base XE nonlinear regression function in the full curve analysis bundle, according to Peña, 2015.

2.5. Computational Studies

2.5.1. *Molecular structure preparation*

The molecules were drawn in 2D and were converted to the SMILES file format. The CONCORD software within the SYBYL-X suite (Tripos Inc., St. Louis) was then used to read the SMILES file and create the tridimensional structures. The structure similarity map was also generated in the SYBYL-X suite based on the UNITY fingerprints with an outlier radius of 30% and an accuracy horizon of 30%.

2.5.2. *Molecule alignment and pharmacophore perception with GALAHAD*

GALAHAD (Genetic Algorithm with Linear Assignment of Hypermolecular Alignment of Datasets), included in the SYBYL-X suite, was used for the 3D molecular alignment and pharmacophore perception. GALAHAD[34] generates a 3D pharmacophore, and subsequently aligns a set of ligand molecules that presumably bind at a common target site. For the genetic algorithm settings, we used a population size of 100 and 100 interactions, both values surpassing the recommended values, to enhance the visitation function. All molecules were kept flexible for the procedure.

The GALAHAD software identifies a set of ligand conformations that have an optimal combination of low strain energy (ENERGY), steric overlap (STERICS), and pharmacophoric similarity (MOL_QRY). GALAHAD uses a true multi-objective (MO) function in which each term (ENERGY, STERICS and MOL_QRY) is considered independently. The three MO functions constitute a multi-objective triage (MO Triage) approach, which makes use of the Pareto rank for each individual model. Among models with a Pareto ranking of zero, we selected the best model based on two different criteria: low energy scores and thorough visual inspection of the best alignment.

2.5.3. 3D-QSAR analysis

A 3D-QSAR model was obtained using the CoMFA (Comparative Molecular Field Analysis) method implemented in the SYBYL-X suite. The alignment resulting from the pharmacophore model produced by GALAHAD was used as the input for the CoMFA, and several available charge assignment methods were tested. From the initial dataset containing 50 molecules, 6 molecules were removed, either due to bearing very dissimilar structures (**LpQM-01** and **LpQM-02**), SAR inconsistency (**LpQM-32**), or very low activity (**LpQM-03, 04** and **05**).

The remaining 44 molecules were separated in two distinct sets: a training set containing 38 molecules and a test set containing 6 molecules. The limited number of molecules prompted us to keep the training set as large as possible to obtain a robust QSAR model. The selection of the test molecules was designed to span the entire pIC₅₀ range; therefore, we selected one test molecule for every 7 training molecules, observing the pIC₅₀ scale, from higher to lower values.

Partial least square (PLS) analysis was used to correlate the CoMFA fields to the observed compound potencies in the biological assay and was performed using the SYBYL-X default parameters. The pIC₅₀ values, i.e., log (1/IC₅₀), were used as a measure of the biological activity of the compound. IC₅₀ refers to the compound concentration required for 50% reduction in the *T. cruzi* amastigotes load in infected NIH-3T3 mouse fibroblasts. The correlation between the predicted and observed values of the created models was calculated, and the Q² values were used in the selection of the best model. The pIC₅₀ values of the molecules in the test set were then predicted using the generated CoMFA QSAR models.

3. Results and discussion

3.1. Structure-activity relationships (SAR) analysis

In this study, we performed a screen of 50 compounds on NIH-3T3 fibroblasts infected with a recombinant Tulahuen strain of *T. cruzi* expressing the β-galactosidase reporter. This type of assay allows the identification of compounds that inhibit intracellular amastigotes. An important criterion in the search for active compounds against

intracellular parasites with therapeutic potential is their low toxicity to mammalian host cells[35].

HepG2 cells are a useful model as a primary toxicity screen due to their human origin, ease of manipulation and because they exhibit a variety of cellular responses to different drugs[14,36]. Our cytotoxicity assay results showed that 43 compounds presented low toxicity ($TC_{50} > 100 \mu\text{M}$) to HepG2 cells.

According to the criteria established for considering a compound active on *T. cruzi* (Section 2.3.), our assay identified 26 compounds that inhibited the *T. cruzi* viability into NIH/3T3 cells (**Table S2**). In parallel, we evaluated the toxicity to mammalian host cells to determine if these compounds were cytotoxic to NIH-3T3 cells and thus false positives. This secondary screen identified 14 compounds that reduced the viability of host NIH-3T3 cells, therefore, these compounds were excluded as viable hits. Twelve compounds, which exhibited selective trypanocidal activity (at least 10-fold activity versus toxicity), were members of two chemical classes (thiosemicarbazone and thiazole) (**Figure 2**).

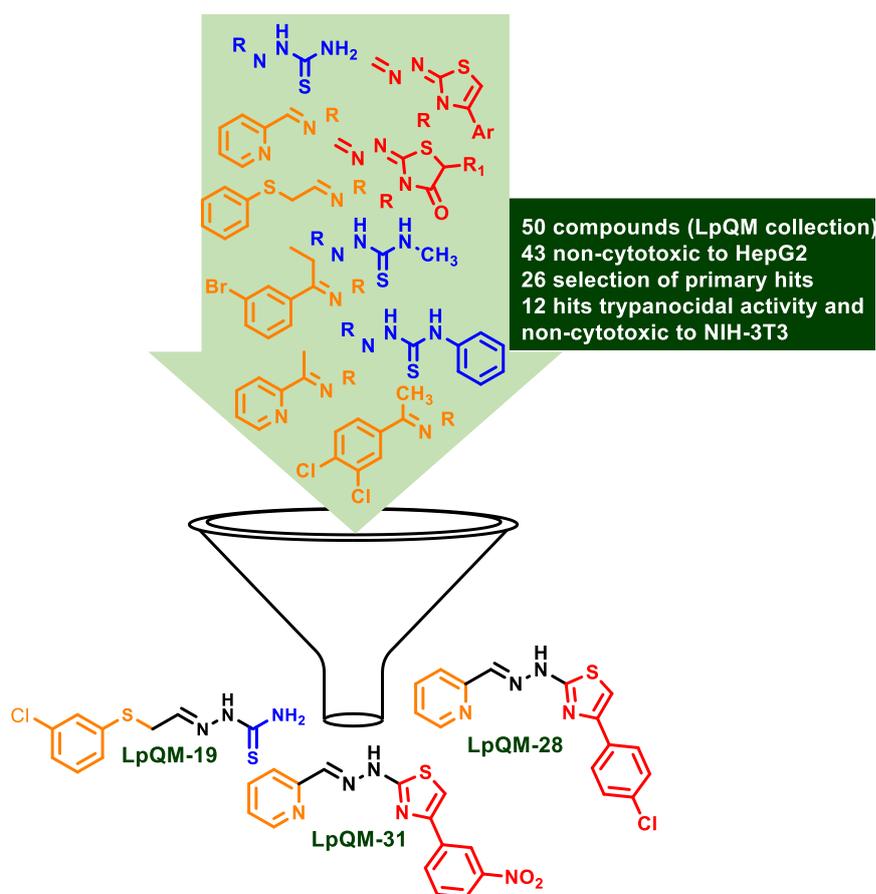


Figure 2: Compound profiling progression cascade leading to confirmed *T. cruzi*-positive compounds.

Comparing the anti-*T. cruzi* activity of thiosemicarbazone **LpQM-01** ($IC_{50} = 0.63 \mu M$) with thiazolidinones **LpQM-03-05** and thiazoles **LpQM-06-09**, it was found that the cyclization strategy was deleterious to the activity against the parasite. On the other hand, cyclic compounds exhibited lower cytotoxicity for NIH-3T3 cells than the non-cyclic compound **LpQM-01** ($TC_{50} = 17.78 \mu M$).

The thiophenol-2-ylidene-thiosemicarbazones (**LpQM-10-21**), which have a spacer group (-S-CH₂-) between the phenyl ring and the thiosemicarbazone moiety, exhibited a lower trypanocidal profile than the thiosemicarbazone **LpQM-01**, but showed more promising selectivity indices against the parasite in general, especially compound 1-(2-*m*-chlorophenylthioethylidene) thiosemicarbazone (**LpQM-19**), which exhibited an $IC_{50} = 1.78 \mu M$ for the *T. cruzi* and $TC_{50} > 100 \mu M$ for HepG2 cells.

Comparing the anti-*T. cruzi* potency of all classes of compounds evaluated in the HTS assay, the arylidene-pyridyl-thiazoles (**LpQM-22-45**) were the most promising sub-series. Except for compounds **LpQM-31** and **LpQM-32**, all of the arylidene-pyridyl-thiazoles exhibited $IC_{50} \leq 3 \mu M$. Furthermore, compounds **LpQM-30**, **LpQM-43** and **LpQM-45** had the most potent trypanocidal activity, with IC_{50} values below $1 \mu M$. Although these compounds exhibited better antiparasitic profiles, they exhibited high toxicity to NIH-3T3, with TC_{50} of 10.72, 3.63 and $4.4 \mu M$, respectively.

In contrast, none of the derivatives of *m*-bromo-phenyl-methylidene-thiazoles (**LpQM-46-50**) exhibited significant anti-*T. cruzi* activity. The main structural difference between the **LpQM-22-45** sub-series and **LpQM-06-09** and **LpQM-46-50** is the presence of the 2-pyridyl group linked at N1. These results indicate that the 2-pyridyl moiety constitutes an important core for antiparasitic activity.

Taking into account the selectivity of these 2-pyridyl-arylidene-1,3-thiazoles derivatives (**LpQM-22-45**), compounds 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole (**LpQM-28**) and 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3-nitrophenyl)-1,3-thiazole (**LpQM-31**) were the most promising molecules of all series tested. These compounds displayed the highest activity against *T. cruzi*, with IC_{50} values of 1.86 and $1.62 \mu M$ respectively, with a selectivity index (SI) greater than 50. **Figure 3** shows the representative curves of the three best compounds in the anti-*T. cruzi* activity. (**LpQM-19**, **LpQM-28** and **LpQM-31**).

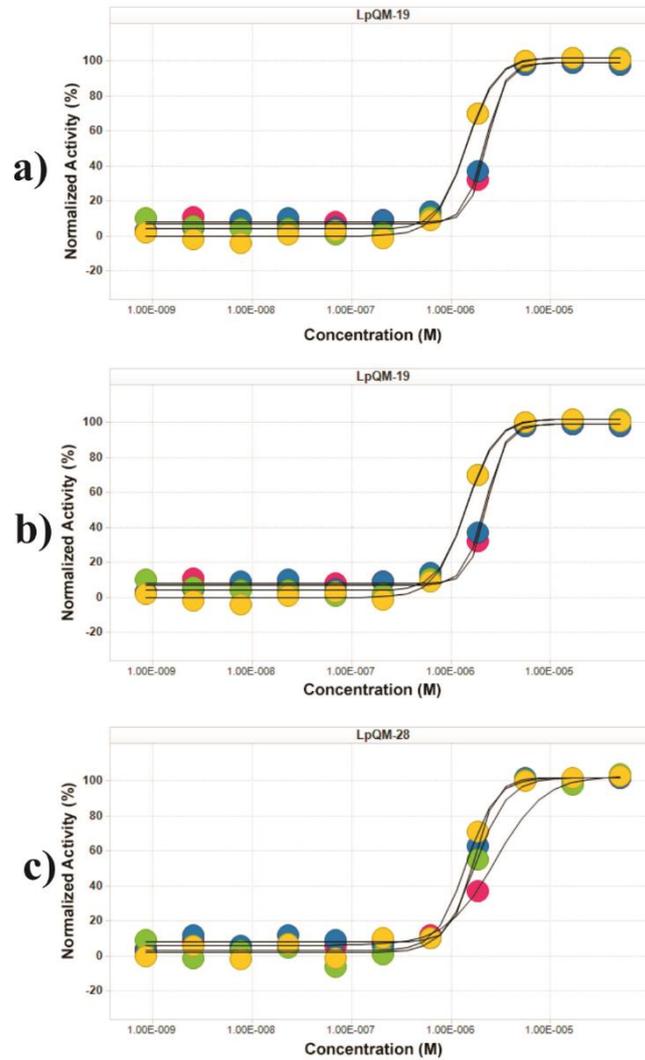


Figure 3: Drugs dose-response curves. Representative curves of **LpQM-19** (a), **28** (b) and **31** (c) normalized activities (%) against *T. cruzi* amastigotes per compound concentration (M). Each color represents an independent experiment.

The associated anti-*T. cruzi* activity and toxicity of these compounds are shown in **Figure 4**.

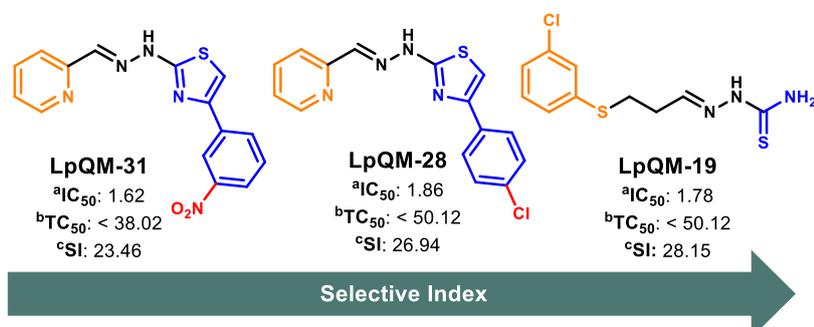


Figure 4: Inhibition of *T. cruzi* by 3 compounds selected from the HTS. $^a\text{IC}_{50}$ (μM) for amastigotes; $^b\text{TC}_{50}$ (μM) for NIH-3T3 mouse fibroblasts; ^cSI : Selective index.

3.2. QSAR results

All 50 molecules were initially analyzed with respect to their structural features and were plotted on a structure similarity map (**Figure 5**). The structures could be classified into four distinct groups, here identified as A, B, C and D.

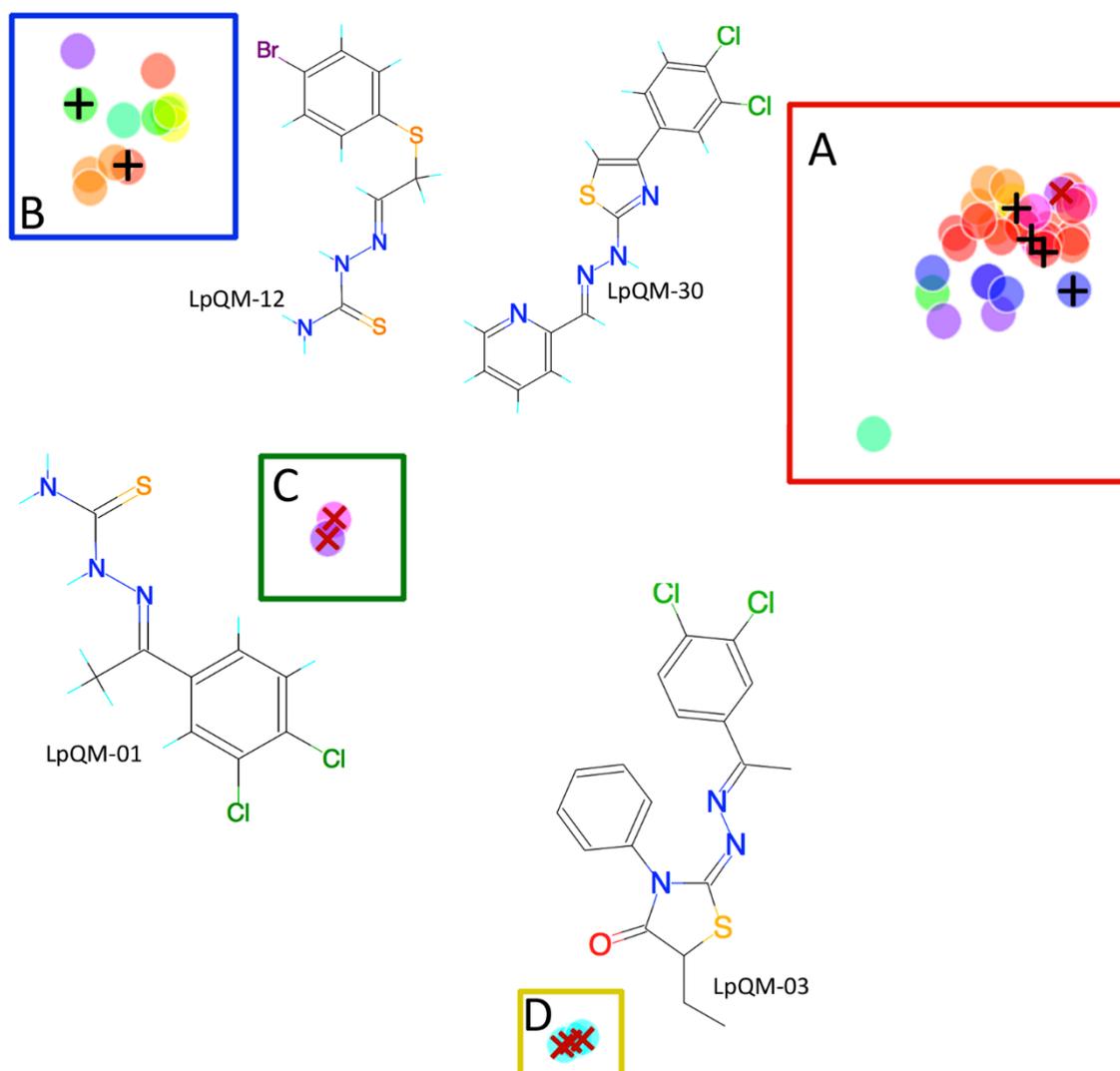


Figure 5: Structure similarity map of the 50 molecules in the initial dataset. The color code indicates the molecule's pIC50, the red circles show high pIC50 and blue circles show low pIC50 values. The structures were separated into four distinct groups, referred as A, B C and D. For each group, the molecule with the highest pIC50 value was displayed. The compounds which composed the test group are marked with a black cross and the ones that were excluded from the QSAR analysis are marked with a red "x".

The C group was composed of only two molecules (**LPQM-01** and **LPQM-02**) whose structures differed significantly from the others. Besides, these molecules had very different pIC_{50} values despite their structural similarity. The members of the D group, **LpQM-03**, **LpQM-04** and **LpQM-05**, all displayed very low activity. Therefore, as mentioned in the methods section, both groups were removed from further QSAR analysis. In addition, the aforementioned compound **LpQM-32** was also disregarded due to SAR inconsistency, i.e. in spite of sharing high structural similarity with the remaining thiazoles, its pIC_{50} was considerably lower. The six compounds that were removed from further analysis are identified with a red "X" in the structure similarity map. Similarly, the compounds which were assigned to the test group of the QSAR analysis are marked with a black cross. **Figure 6** shows the superimposed structures of the 44 molecules used in the QSAR analysis after alignment using GALAHAD[34].

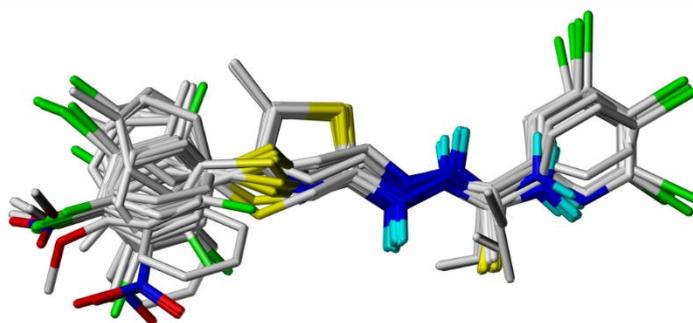


Figure 6: GALAHAD alignment of the 44 molecules selected for the QSAR analysis. The GALAHAD population size and generations were both set to 100.

The pharmacophoric model built by the GALAHAD algorithm is also depicted in **Figure 7**, along with the structure of compound **LpQM-30** (the most active compound analysed). The model is composed by eight features: three acceptor atoms (AA), three hydrophobic sites (HY), one positive hydrogen (NP) and one donor atom (DA). The pyridine nitrogen is the center for AA and DA features while the hydrazine moiety is involved with AA and NP features.

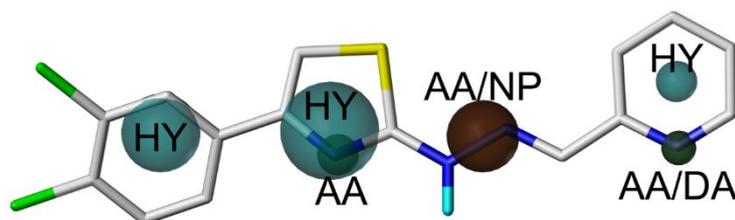


Figure 7: Pharmacophoric model produced by GALAHAD. This model presented an ENERGY value of 12.99, a STERICS value of 139, a MOL_QRY value of 32.62 and a HBOND value of 97. Blue spheres represent hydrophobic centers (HY), green spheres represent acceptor atoms (AA), red spheres represent positive nitrogens (NP) and magenta spheres represent donor atoms (DA). There are two pharmacophore superpositions AA/NP and AA/DA.

The experimental and predicted pIC_{50} values for both the training (black) and test (red) sets are plotted along with their regression lines in **Figure 8** and are listed in **Table 1**. This CoMFA model had an r^2 value of 0.998 and a Q^2 of 0.803, indicating good internal predictive power. The pIC_{50} predictions for the structures in the test set were also acceptable, and the differences between the predicted values and the actual values did not exceed one log unit. The latter indicates that we have produced a model that is capable of estimating the biological activity of similar molecules, i.e., thiazoles or thioethers, bearing the hydrazine moiety and a cyclic hydrophobic moiety.

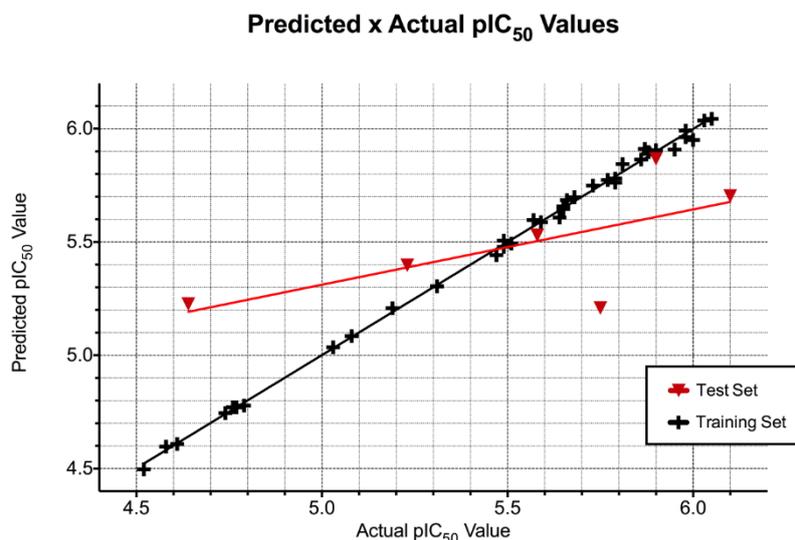


Figure 8: Scatter plots and regression lines of the predicted and actual pIC_{50} values*. Red triangles represent the molecules in the test set and black crosses represent the molecules in the training set. The r^2 value was 0.998 for the training set. * anti- *T. cruzi* activity.

Table 1: Experimental and predicted pIC_{50} values for the selected compounds.

Compound	Experimental pIC ₅₀	Predicted pIC ₅₀	Residual
LpQM-14	5.31	5.305	0.005
LpQM-15	5.49	5.479	0.011
LpQM-18	5.51	5.493	0.017
LpQM-19	5.75	52.088	0.5412
LpQM-21	5.59	5.587	0.003
LpQM-23	5.58	55.299	0.0501
LpQM-28	5.73	5.749	-0.019
LpQM-29	5.98	5.992	-0.012
LpQM-30	6.1	57.029	0.3971
LpQM-31	5.79	5.78	0.01
LpQM-44	5.9	5.905	-0.005

Figure 9 shows the CoMFA fields of the QSAR model along with the structure of **LpQM-28**, **LpQM-31** and **LpQM-43**. **LpQM-43** was the most active compound in the training set. The green areas correspond to the sites where steric bulk is positively correlated to anti-*T. cruzi* activity, and the yellow areas correspond to the sites where steric bulk is negatively correlated. Similarly, blue areas correspond to sites where positive charges are correlated with the biological activity, and red areas correspond to sites where negative charges are correlated.

Interesting features of the CoMFA model in **Figure 9** are the large yellow and green areas around the hydrazone group, indicating both unfavourable and favourable locations for the insertion of bulky substituents, respectively. Distinctly from **LpQM-31**, **LpQM-43** can achieve higher anti-*T. cruzi* activity by placing a methyl group near this green region, possibly explaining the slight potency difference between the two compounds. Additionally, on the opposite end of the model there are two green areas, suggesting that placement of bulky groups in this location is correlated with higher activity. Compounds such as **LpQM-19**, **28** and **31** satisfy this condition by bearing a thiazole and a phenyl ring near those areas. Regarding the electrostatic contribution, the model shows a remarkably large blue area extending from the hydrazone group to the aryl substituent in thiazole containing molecules, indicating that compounds lining electron deficient atoms in these regions exhibit higher activity. For instance, compounds carrying electron-withdrawing groups in the phenyl ring attached to the thiazole nucleus, such as **LpQM-43** (3-NO₂) or **LpQM-28** (4-Cl), favourably positions a number of electron deficient atoms. On the opposite end of the model, two red areas indicate regions where higher electron densities are correlated with improved anti-*T. cruzi* activity. That is the case of thiazoles containing a pyridine group, such as **LpQM-**

19, 28 and **31**, which favourably locates the electronegative pyridine nitrogen in this region.

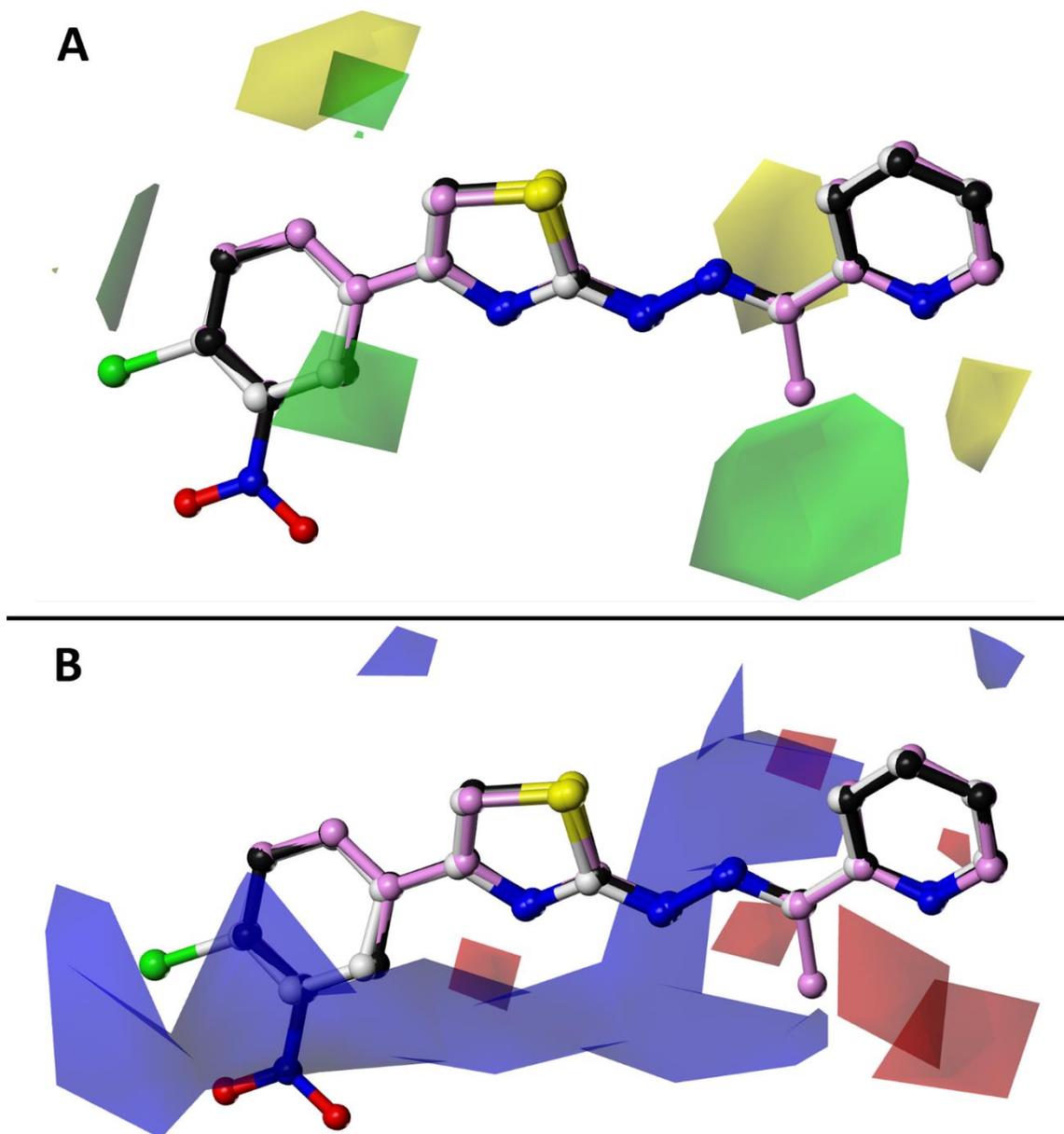


Figure 9: Superimposed ball and stick representation of compounds **LpQM-28** (white), **LpQM-31** (black) and **LpQM-43** (pink) along with CoMFA steric (A) and electrostatic (B) fields. Green areas (80% contribution) indicate regions where bulky groups positively correlates to anti-*T. cruzi* activity. Yellow areas (20% contribution) indicate regions where bulky groups negatively correlates to anti-*T. cruzi* activity. Similarly, the electrostatic contributions are also indicated: blue areas (80% contribution) indicate regions where positive charges positively correlates to anti-*T. cruzi* activity and red areas (20% contribution) indicate regions where negative charges positively correlates to anti-*T. cruzi* activity.

4. Conclusions

The HTS and QSAR studies were performed on a library of fifty compounds sharing a hydrazone group as a common core. The HTS-compatible assay identified compounds **LpQM-19**, **28** and **31** as high anti-*T. cruzi* agents and as non-toxic to mammalian cells, leading to a selectivity index of up to 20. Additionally, the QSAR analysis produced a model that was capable of estimating the biological activity for similar molecules. These results provide new candidates for the development of treatments against Chagas disease.

Acknowledgments

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) for financial support. From GlaxoSmithKline, Tres Cantos, Spain, we thank Isro Gloger, Silvia Gonzalez, Imanol Peña, Juan Cantizani, Julio Alonso-Padilla and Vanessa Barroso for the technical assistance in the screening. M.V.O.C. thank FACEPE by granting a researcher fixation scholarship (BFP-0107-4.03/12).

References

- [1] L. de F. Diniz, J.A. Urbina, I.M. de Andrade, A.L. Mazzeti, T.A.F. Martins, I.S. Caldas, et al., Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2367. doi:10.1371/journal.pntd.0002367.
- [2] C.M. Ayo, M.M. de O. Dalalio, J.E.L. Visentainer, P.G. Reis, E.Â. Sippert, L.R. Jarduli, et al., Genetic Susceptibility to Chagas Disease: An Overview about the Infection and about the Association between Disease and the Immune Response Genes, *Biomed Res. Int.* 2013 (2013) 1–13. doi:10.1155/2013/284729.
- [3] Y. Jackson, E. Chatelain, A. Mauris, M. Holst, Q. Miao, F. Chappuis, et al., Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment., *BMC Infect. Dis.* 13 (2013) 85. doi:10.1186/1471-2334-13-85.
- [4] R.L. Kessler, M.J. Soares, C.M. Probst, M.A. Krieger, *Trypanosoma cruzi* response to sterol biosynthesis inhibitors: morphophysiological alterations leading to cell death., *PLoS One.* 8 (2013) e55497. doi:10.1371/journal.pone.0055497.
- [5] H.J. Wiggers, J.R. Rocha, W.B. Fernandes, R. Sesti-Costa, Z.A. Carneiro, J. Cheleski, et al., Non-peptidic cruzain inhibitors with trypanocidal activity discovered by virtual screening and in vitro assay., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2370. doi:10.1371/journal.pntd.0002370.
- [6] J.L. Siqueira-Neto, O.-R. Song, H. Oh, J.-H. Sohn, G. Yang, J. Nam, et al., Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) e675. doi:10.1371/journal.pntd.0000675.
- [7] E. Bettiol, M. Samanovic, A.S. Murkin, J. Raper, F. Buckner, A. Rodriguez, Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi* by chemical library screening., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3 (2009) e384. doi:10.1371/journal.pntd.0000384.
- [8] H. Alves, K. Dechering, C. Van Blitterswijk, J. De Boer, High-throughput assay for the identification of compounds regulating osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells., *PLoS One.* 6 (2011) e26678. doi:10.1371/journal.pone.0026678.
- [9] S. Moon, J.L. Siqueira-Neto, C.B. Moraes, G. Yang, M. Kang, L.H. Freitas-

- Junior, et al., An image-based algorithm for precise and accurate high throughput assessment of drug activity against the human parasite *Trypanosoma cruzi*., *PLoS One*. 9 (2014) e87188. doi:10.1371/journal.pone.0087188.
- [10] N. Aulner, A. Danckaert, E. Rouault-Hardoin, J. Desrivot, O. Helynck, P.-H. Commere, et al., High content analysis of primary macrophages hosting proliferating *Leishmania amastigotes*: application to anti-leishmanial drug discovery., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (2013) e2154. doi:10.1371/journal.pntd.0002154.
- [11] R. Don, J.-R. Ioset, Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections., *Parasitology*. 141 (2014) 140–6. doi:10.1017/S003118201300142X.
- [12] E. Chatelain, Chagas disease drug discovery: toward a new era., *J. Biomol. Screen.* 20 (2015) 22–35. doi:10.1177/1087057114550585.
- [13] A.M.C. Canavaci, J.M. Bustamante, A.M. Padilla, C.M. Perez Brandan, L.J. Simpson, D. Xu, et al., In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4 (2010) e740. doi:10.1371/journal.pntd.0000740.
- [14] G. Andriani, A.-D.C. Chessler, G. Courtemanche, B.A. Burleigh, A. Rodriguez, Activity in vivo of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds selected from a high throughput screening., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5 (2011) e1298. doi:10.1371/journal.pntd.0001298.
- [15] D. Sereno, A. Cordeiro da Silva, F. Mathieu-Daude, A. Ouaiissi, Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures, *Parasitol. Int.* 56 (2007) 3–7. doi:10.1016/j.parint.2006.09.001.
- [16] X. Du, E. Hansell, J.C. Engel, C.R. Caffrey, F.E. Cohen, J.H. McKerrow, Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents, *Chem. Biol.* 7 (2000) 733–742. doi:10.1016/S1074-5521(00)00018-1.
- [17] J.M. dos Santos Filho, A.C.L. Leite, B.G. de Oliveira, D.R.M. Moreira, M.S. Lima, M.B.P. Soares, et al., Design, synthesis and cruzain docking of 3-(4-substituted-aryl)-1,2,4-oxadiazole-N-acylhydrazones as anti-*Trypanosoma cruzi* agents., *Bioorg. Med. Chem.* 17 (2009) 6682–91. doi:10.1016/j.bmc.2009.07.068.
- [18] N.C. Romeiro, G. Aguirre, P. Hernández, M. González, H. Cerecetto, I. Aldana, et al., Synthesis, trypanocidal activity and docking studies of novel quinoxaline-N-acylhydrazones, designed as cruzain inhibitors candidates, *Bioorg. Med.*

- Chem. 17 (2009) 641–652. doi:10.1016/j.bmc.2008.11.065.
- [19] J.M. dos Santos Filho, D.R.M. Moreira, C.A. de Simone, R.S. Ferreira, J.H. McKerrow, C.S. Meira, et al., Optimization of anti-Trypanosoma cruzi oxadiazoles leads to identification of compounds with efficacy in infected mice., *Bioorg. Med. Chem.* 20 (2012) 6423–33. doi:10.1016/j.bmc.2012.08.047.
- [20] T. Franklim, L. Freire-de-Lima, J. de Nazareth Sá Diniz, J. Previato, R. Castro, L. Mendonça-Previato, et al., Design, Synthesis and Trypanocidal Evaluation of Novel 1,2,4-Triazoles-3-thiones Derived from Natural Piperine, *Molecules*. 18 (2013) 6366–6382. doi:10.3390/molecules18066366.
- [21] K. Brak, P.S. Doyle, J.H. McKerrow, J.A. Ellman, Identification of a new class of nonpeptidic inhibitors of cruzain., *J. Am. Chem. Soc.* 130 (2008) 6404–10. doi:10.1021/ja710254m.
- [22] K. Brak, I.D. Kerr, K.T. Barrett, N. Fuchi, M. Debnath, K. Ang, et al., Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy., *J. Med. Chem.* 53 (2010) 1763–73. doi:10.1021/jm901633v.
- [23] X. Du, C. Guo, E. Hansell, P.S. Doyle, C.R. Caffrey, T.P. Holler, et al., Synthesis and Structure–Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 2695–2707. doi:10.1021/jm010459j.
- [24] D.C. Greenbaum, Z. Mackey, E. Hansell, P. Doyle, J. Gut, C.R. Caffrey, et al., Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against Plasmodium falciparum, Trypanosoma brucei, and Trypanosoma cruzi., *J. Med. Chem.* 47 (2004) 3212–9. doi:10.1021/jm030549j.
- [25] R. Siles, S.-E. Chen, M. Zhou, K.G. Pinney, M.L. Trawick, Design, synthesis, and biochemical evaluation of novel cruzain inhibitors with potential application in the treatment of Chagas' disease., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 4405–9. doi:10.1016/j.bmcl.2006.05.041.
- [26] J.W.P. Espíndola, M.V. de O. Cardoso, G.B. de O. Filho, D.A. Oliveira e Silva, D.R.M. Moreira, T.M. Bastos, et al., Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi cruzain, *Eur. J. Med. Chem.* 101 (2015) 818–835. doi:10.1016/j.ejmech.2015.06.048.
- [27] M.E. Caputto, A. Ciccarelli, F. Frank, A.G. Moglioni, G.Y. Moltrasio, D. Vega,

- et al., Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolyldrazone derivatives as anti-Trypanosoma cruzi agents, *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 155–163. doi:10.1016/j.ejmech.2012.07.013.
- [28] D.R.M. Moreira, S.P.M. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, G.B. de Oliveira Filho, C.M.L. de Melo, et al., Structural investigation of anti-Trypanosoma cruzi 2-iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice., *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10918–36. doi:10.1021/jm301518v.
- [29] M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, A.C.L. Leite, M.V.O. Cardoso, D.R.M. Moreira, D.J. Brondani, et al., Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldrazone-based potent antitrypanosomal agents., *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 7826–35. doi:10.1016/j.bmc.2010.09.056.
- [30] A.C.L. Leite, D.R. de M. Moreira, M.V. de O. Cardoso, M.Z. Hernandez, V.R. Alves Pereira, R.O. Silva, et al., Synthesis, Cruzain docking, and in vitro studies of aryl-4-oxothiazolyldrazones against Trypanosoma cruzi., *ChemMedChem.* 2 (2007) 1339–45. doi:10.1002/cmdc.200700022.
- [31] M.V. de O. Cardoso, L.R.P. de Siqueira, E.B. da Silva, L.B. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, et al., 2-Pyridyl thiazoles as novel anti- Trypanosoma cruzi agents : Structural design , synthesis and pharmacological evaluation, *Eur. J. Med. Chem.* 86 (2014) 48–59. doi:10.1016/j.ejmech.2014.08.012.
- [32] I. Peña, M. Pilar Manzano, J. Cantizani, A. Kessler, J. Alonso-Padilla, A.I. Bardera, et al., New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource., *Sci. Rep.* 5 (2015) 8771. doi:10.1038/srep08771.
- [33] F.S. Buckner, C.L. Verlinde, A.C. La Flamme, W.C. Van Voorhis, Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase., *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (1996) 2592–7.
- [34] N.J. Richmond, C.A. Abrams, P.R.N. Wolohan, E. Abrahamian, P. Willett, R.D. Clark, GALAHAD: 1. Pharmacophore identification by hypermolecular alignment of ligands in 3D, *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 20 (2006) 567–587. doi:10.1007/s10822-006-9082-y.
- [35] T.L. de B. Moreira, A.F.S. Barbosa, P. Veiga-Santos, C. Henriques, A. Henriques-Pons, S.L. Galdino, et al., Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi, *Int. J. Antimicrob. Agents.* 41 (2013) 183–187. doi:10.1016/j.ijantimicag.2012.09.018.

- [36] R.B. Sun, Z.G. Xi, J. Yan, H.L. Yang, Cytotoxicity and apoptosis induction in human HepG2 hepatoma cells by decabromodiphenyl ethane., *Biomed. Environ. Sci.* 25 (2012) 495–501. doi:10.3967/0895-3988.2012.05.001.

List of Captions

Figure 1: Compound Library tested. (the complete structure of compounds is presented in **Table S1**)

Figure 2: Compound profiling progression cascade leading to confirmed *T. cruzi*-positive compounds.

Figure 3: Drugs dose-response curves. Representative curves of **LpQM-19** (a), **28** (b) and **31** (c) normalized activities (%) against *T. cruzi* amastigotes per compound concentration (M). Each color represents an independent experiment.

Figure 4: Inhibition of *T. cruzi* by 3 compounds selected from the HTS. ^aIC₅₀ (μM) for amastigotes; ^bTC₅₀ (μM) for NIH-3T3 mouse fibroblasts; ^cSelective index.

Figure 5: Structure similarity map of the 50 molecules in the initial dataset. The color code indicates the molecule's pIC₅₀, the red circles show high pIC₅₀ and blue circles show low pIC₅₀ values. The structures were separated into four distinct groups, referred as A, B C and D. For each group, the molecule with the highest pIC₅₀ value was displayed. The compounds which composed the test group are marked with a black cross and the ones that were excluded from the QSAR analysis are marked with a red "x".

Figure 6: GALAHAD alignment of the 44 molecules selected for the QSAR analysis. The GALAHAD population size and generations were both set to 100.

Figure 7: Pharmacophoric model produced by GALAHAD. This model presented an ENERGY value of 12.99, a STERICs value of 139, a MOL_QRY value of 32.62 and a HBOND value of 97. Blue spheres represent hydrophobic centers (HY), green spheres represent acceptor atoms (AA), red spheres represent positive nitrogens (NP) and magenta spheres represent donor atoms (DA). There are two pharmacophore superpositions AA/NP and AA/DA.

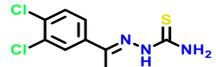
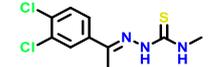
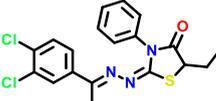
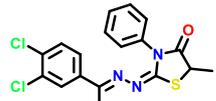
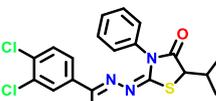
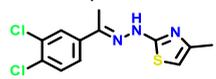
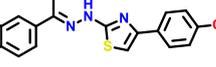
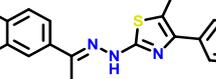
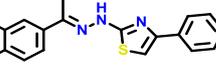
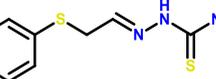
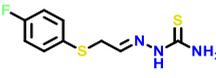
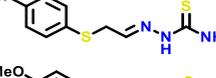
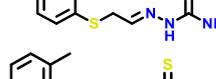
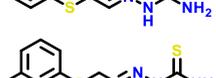
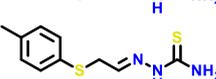
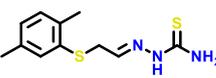
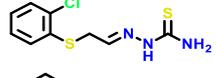
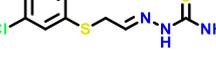
Figure 8: Scatter plots and regression lines of the predicted and actual pIC₅₀ values*. Red triangles represent the molecules in the test set and black crosses represent the molecules in the training set. The r² values were 0.998 for the training set and 0.444 for the test set.

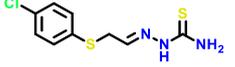
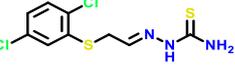
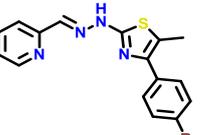
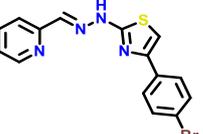
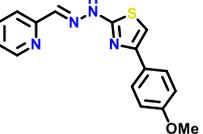
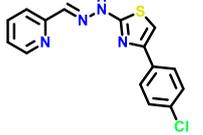
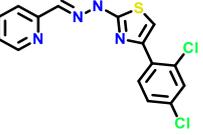
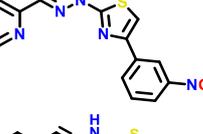
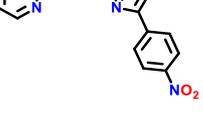
Figure 9: Superimposed ball and stick representation of compounds **LpQM-28** (white), **LpQM-31** (black) and **LpQM-43** (pink) along with CoMFA steric (A) and electrostatic (B) fields. Green areas (80% contribution) indicate regions where bulky groups positively correlates to anti-*T. cruzi* activity. Yellow areas (20% contribution) indicate regions where bulky groups negatively correlates to anti-*T. cruzi* activity. Similarly, the electrostatic contributions are also indicated: blue areas (80% contribution) indicate regions where positive charges positively correlates to anti-*T. cruzi* activity and red areas (20% contribution) indicate regions where negative charges positively correlates to anti-*T. cruzi* activity.

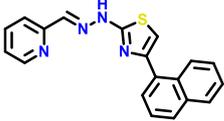
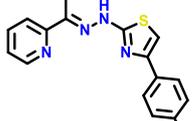
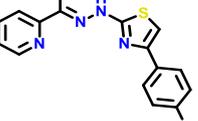
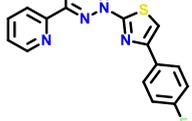
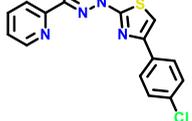
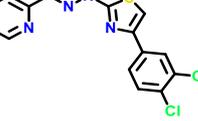
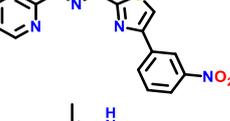
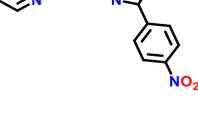
Table 1: Experimental and predicted pIC₅₀ values for the selected compounds.

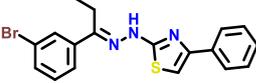
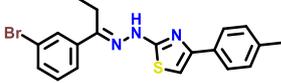
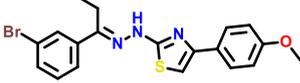
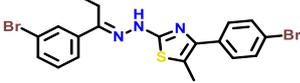
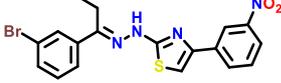
SUPPLEMENTARY MATERIAL

S1: Tested Compounds

Compound	Structure	M.W.	<i>T. cruzi</i> IC ₅₀ (μM)	3T3 TC ₅₀ (μM)	HepG2 TC ₅₀ (μM)
LpQM-01		262.16	0.63	17.78	43.65
LpQM-02		276.19	16.98	> 50.12	>100
LpQM-03		406.33	>50.12	>50.12	>100
LpQM-04		392.3	>50.12	>50.12	>100
LpQM-05		420.36	>50.12	>50.12	>100
LpQM-06		300.21	8.32	38.9	>100
LpQM-07		392.3	16.98	>50.12	>100
LpQM-08		376.3	4.9	28.18	>100
LpQM-09		380.27	16.22	28.18	>100
LpQM-10		225.33	9.33	3.55	>100
LpQM-11		243.32	5.89	>50.12	>100
LpQM-12		304.22	1.62	28.84	53.7
LpQM-13		255.35	17.38	0.52	>100
LpQM-14		239.35	4.9	>50.12	>100
LpQM-15		239.35	3.24	>50.12	>100
LpQM-16		239.35	6.46	>50.12	>100
LpQM-17		253.38	3.24	20.89	>100
LpQM-18		259.77	3.09	>50.12	>100
LpQM-19		259.77	1.78	>50.12	>100

LpQM-20		259.77	2.09	39.81	75.86
LpQM-21		294.25	2.57	>50.12	>100
LpQM-22		280.08	2.19	16.98	>100
LpQM-23		294.09	2.63	43.65	>100
LpQM-24		372	1.38	18.62	>100
LpQM-25		357.99	2.24	14.13	>100
LpQM-26		298.07	2.29	>50.12	18.2
LpQM-27		310.09	2.69	11.48	>100
LpQM-28		314.04	1.86	>50.12	>100
LpQM-29		348	1.05	14.45	>100
LpQM-30		348	0.79	10.72	>100
LpQM-31		325.06	1.62	38.02	>100
LpQM-32		325.06	10.96	>50.12	>100

LpQM-33		330.09	3.39	7.24	>100
LpQM-34		294.09	1.12	3.89	91.2
LpQM-35		308.1	1.7	4.47	>100
LpQM-36		386.01	1.35	2	>100
LpQM-37		372	1	3.98	85.11
LpQM-38		312.18	1.32	4.9	91.2
LpQM-39		324.1	2.24	3.47	>316.23
LpQM-40		328.05	1.05	5.25	>100
LpQM-41		362.01	1.55	2	>100
LpQM-42		362.01	1.26	2.34	>100
LpQM-43		339.08	0.89	3.63	>100
LpQM-44		339.08	1.26	20.89	>100

LpQM-45		344.11	0.93	4.47	>100
LpQM-46		386.31	18.2	26.3	>100
LpQM-47		399.04	26.3	>50.12	>100
LpQM-48		416.33	30.2	>50.12	>100
LpQM-49		479.23	24.55	33.11	>100
LpQM-50		431.31	22.91	38.02	>100

S2: Positive compounds

Compound	M.W.	<i>T. cruzi</i>	3T3	HepG2
		IC ₅₀ (μM)	TC ₅₀ (μM)	TC ₅₀ (μM)
LpQM-06	300.21	8.32	38.9	>100
LpQM-08	376.30	4.9	28.18	>100
LpQM-11	243.32	5.89	>50.12	>100
LpQM-14	239.35	4.9	>50.12	>100
LpQM-15	239.35	3.24	>50.12	>100
LpQM-16	239.35	6.46	>50.12	>100
LpQM-17	253.38	3.24	20.89	>100
LpQM-18	259.77	3.09	>50.12	>100
LpQM-19	259.77	1.78	>50.12	>100
LpQM-21	294.25	2.57	>50.12	>100
LpQM-22	280.08	2.19	16.98	>100
LpQM-23	294.09	2.63	43.65	>100
LpQM-24	372.00	1.38	18.82	>100
LpQM-25	357.99	2.24	14.13	>100
LpQM-27	310.09	2.69	11.48	>100
LpQM-28	314.04	1.86	>50.12	>100
LpQM-29	348.00	1.05	14.45	>100
LpQM-30	348.00	0.79	10.72	>100
LpQM-31	325.06	1.62	38.02	>100
LpQM-32	325.06	10.96	>50.12	>100
LpQM-33	330.09	3.39	7.24	>100
LpQM-35	308.1	1.7	4.47	>100
LpQM-40	328.05	1.05	5.25	>100
LpQM-43	339.08	0.89	3.63	>100
LpQM-44	339.08	1.26	20.89	>100
LpQM-45	344.11	0.93	4.47	>100

S3: Selected compounds

Compound	M.W.	<i>T. cruzi</i> IC₅₀ (μM)	3T3 TC₅₀ (μM)	HepG2 TC₅₀ (μM)
LpQM-14	239.35	4.9	>50.12	>100
LpQM-15	239.35	3.24	>50.12	>100
LpQM-18	259.77	3.09	>50.12	>100
LpQM-19	259.77	1.78	>50.12	>100
LpQM-21	294.25	2.57	>50.12	>100
LpQM-23	294.09	2.63	43.65	>100
LpQM-24	372.00	1.38	18.82	>100
LpQM-28	314.04	1.86	>50.12	>100
LpQM-29	348.00	1.05	14.45	>100
LpQM-30	348.00	0.79	10.72	>100
LpQM-31	325.06	1.62	38.02	>100
LpQM-44	339.08	1.26	20.89	>100

10 CONCLUSÕES

- a) O HTS se mostrou uma técnica eficiente e satisfatória na triagem de compostos. Entre as séries de moléculas testadas, as tiossemicarbazonas apresentaram as melhores atividades leishmanicida e tripanocida, sendo as moléculas mais promissoras por apresentarem altos índices de seletividade em relação à forma mais relevantes dos parasitos;
- b) A baixa citotoxicidade dos compostos sobre as células de mamíferos, especialmente frente às células da linhagem HepG2, somados aos índices de seletividade, apontam seu uso para a realização de possíveis ensaios *in vivo*.
- c) O composto LpQM-15 se mostrou o mais promissor da série de tiossemicarbazonas selecionadas contra *Leishmania donovani*, por apresentar alta atividade leishmanicida e baixa citotoxicidade para as células de mamífero.
- d) O ensaio frente ao *T. cruzi*, selecionou os compostos **LpQM-19, 28 e 31** como os agentes antichagásicos mais promissores com índices de seletividade acima de 20, o que possibilita a aplicabilidade dessas moléculas nos projetos de desenvolvimento de fármacos.
- e) Em conjunto, nossos resultados apontam para o uso dos derivados de hidrazonas como potenciais agentes quimioterápicos no tratamento da leishmaniose visceral e da doença de chagas.

REFERÊNCIAS

AFONSO, A.M.; EBELL, M.H.; TARLETON, R.L. A Systematic Review of High Quality Diagnostic Tests for Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, e1881, 2012.

ALIANÇA, A.S.S. et al. The *in Vitro* Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed *Dictyota mertensii* against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 19, p. 14052-14065, 2014.

ALONSO-PADILLA, J. et al. Automated High-Content Assay for Compounds Selectively Toxic to *Trypanosoma cruzi* in a Myoblastic Cell Line. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. 1-17, 2015.

ALONSO-PADILLA J., RODRÍGUEZ A. High Throughput Screening for Anti-*Trypanosoma cruzi* Drug Discovery. **PLoS Neglected Tropical Diseases** v. 8, n.12, e3259, 2014.

ALTINTOP, M.D. et al. Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 58, p. 299-307, 2012.

ALVARENGA, D.D. et al. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p. 194-7, 2010.

ANDRIANI, G. et al. Activity In Vivo of Anti-*Trypanosoma cruzi* Compounds Selected from a High Throughput Screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, e. 1298, 2011.

ARMAH, F.A. et al. Historical Perspective and Risk of Multiple Neglected Tropical Diseases in Coastal Tanzania: Compositional and Contextual Determinants of Disease Risk. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, e. 0003939, 2015.

ASLAN, H.G.; ÖZCAN, S.; KARACAN, N. The antibacterial activity of some sulfonamides and sulfonyl hydrazones, and 2D-QSAR study of a series of sulfonyl hydrazones. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 98, p. 329-36, 2012.

AYO, C.M. et al. Genetic Susceptibility to Chagas Disease: An Overview about the Infection and about the Association between Disease and the Immune Response Genes, **BioMed Research International**, p. 1–13, 2013.

BAHIA, M.T. et al. Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. 1870, 2012.

BARRAL-NETO, M. et al. Human *Leishmania* cytokines. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 149-155, 1998.

BERALDO, H.; GAMBINO, D. The wide pharmacological versatility of semicarbazones, thiosemicarbazones and their metal complexes Mini. **Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 31-39, 2004.

BETTIOL, E. et al. Identification of Three Classes of Heteroaromatic Compounds with Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* by Chemical Library Screening. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 2, e384, 2009.

BEZERRA, J.L. et al. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 631-7, 2006.

BOLHASSANI, A. et al. Fluorescent *Leishmania* species: development of stable GFP expression and its application for in vitro and in vivo studies. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 3, p. 637–645, 2011.

BONDOCK, S.; KHALIFA, W.; FADDA, A.A. Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3, 4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 42, n. 7, p. 948-954, 2007.

BONHIVERS, M. et al. Biogenesis of the Trypanosome Endo-Exocytotic Organelle Is Cytoskeleton Mediated. **PLoS Biology**, v. 6, n. 5, 2008.

BOUKAI, L. K. et al. Trafficking of cysteine proteinase to *Leishmania* lysosomes: lack of involvement of glycosylation. **Molecular Biochemical Parasitology**, v. 107, n. 2, p. 321-325, 2000.

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. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 180 p.: il. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kogar, 2000. p. 431

BRITTA, E.A. et al. Benzaldehyde Thiosemicarbazone Derived from Limonene Complexed with Copper Induced Mitochondrial Dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, e414400, 2012.

BRITTA, E.A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 236, 1-12, 2014.

BUCKNER, F.S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, p. 2592–2597, 1996.

CALLAHAN, H. L. et al. An Axenic Amastigote System for Drug Screening. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 41, n. 4, p. 818–822, 1997.

CAMARGO, L.M.A.; BARCINSKI, M.A. Leishmanioses, Feridas Bravas e Kalazar. **Ciência e Cultura, Edemias/Artigos**, v. 55, n. 1, p. 34-7, 2003.

CANAVACI, A.M.C.J. et al. In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 4, 2010.

CAPUTTO, M. E. et al. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolyhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, n. 55, p. 155-163, 2012.

CAPUTTO, M.E. et al. Thiosemicarbazones derived from 1-indanones as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 6818-6826, 2011.

CARDOSO, M.V. et al. 2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*T. cruzi* agents: Structural design, synthesis and Pharmacological evaluation. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 86, p. 48-59, 2014.

CARVALHO, L.P. et al. Anti-Parasite effects of new Thiosemicarbazones and their Products Thiazolidinone including Cellular aspects of Intracellular Elimination of *Trypanosoma Cruzi* in Vitro. **Journal of Developing Drugs**, v. 3, p. 126, 2014.

CAVALCANTI, D.P. et al. Expression and subcellular localization of kinetoplast-associated proteins in the different developmental stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiology**, v. 9, p. 120, 2009.

CAZZULO, J.J. Proteinases of *Trypanosoma cruzi*: potential targets for the chemotherapy of Chagas disease. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, n. 2, p. 1259–1267, 2002.

CHAGAS, A.P. et al. Potencial anti-*Leishmania* e imunomodulador dos extratos de *Campsiandra laurifolia* Benth. (Fabaceae). **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 1, p. 117-24, 2010.

CHATELAIN, E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. **Journal of biomolecular screening**, v. 20, n. 1, p. 22-35, 2015.

CHIMENTI, F. et al. Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-disubstituted-1,3-thiazoles as anti-*Candida* spp. agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 378-382, 2011.

COLASANTE, C. et al. Proteins and lipids of glycosomal membranes from *Leishmania tarentolae* and *Trypanosoma brucei*. **F1000Research**, v. 2, n. 27, p. 1-15, 2013.

COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMAPAI, R.N.R. Estudo comparativo entre miltefosina oral e antimoniato de N-metil glucamina parenteral no tratamento da leishmaniose experimental causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 424-7, 2008.

CULL, B. et al. Glycosome turnover in *Leishmania major* is mediated by autophagy. **Autophagy**, v. 10, n. 12, p. 2143-2157, 2014.

DANAWATE, P. et al. Synthesis, characterization, molecular docking and cytotoxic activity of novel plumbagin hydrazones against breast cancer cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter**, v. 22, n. 9, p. 3104-8, 2012.

DARZYNKIEWICZ, Z.; STAIANO-COICO, L.; MELAMED, M.R. Increased mitochondrial uptake of rhodamine 123 during lymphocyte stimulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 78, n. 4, p. 2383- 2387, 1981.

DA SILVA, C.F. et al. In Vitro and In Vivo Investigation of the Efficacy of Arylimidamide DB1831 and Its Mesylated Salt Form - DB1965 - against *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, e30356, 2012.

DA SILVA, E.N. et al. On the search for potential anti-*Trypanosoma cruzi* drugs: synthesis and biological evaluation of 2-hydroxy-3-methylamino and 1,2,3-triazolic naphthoquinoidal compounds obtained by click chemistry reactions. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 52, p. 304–312, 2012.

DE MUYLDER, G. et al. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **Neglected Tropical Diseases**. v. 5, n. 7, e1253, 2011.

DE RYCKER, M. et al. Comparison of a High-Throughput High-Content Intracellular *Leishmania donovani* Assay with an Axenic Amastigote Assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2913-2922, 2013.

DE SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 17-36, 1999.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Desing**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002a.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology Research**, v. 88, n. 12, p. 1013-1025, 2002b.

DE SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes - A historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.4, p.313-325, 2008.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **International Journal of Cell Biology**, v. 2010, p. 1-18, 2010.

DINIZ, L.F. et al. Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, e2367, 2013.

DIRO, E. et al. Visceral Leishmaniasis and HIV Coinfection in East Africa. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 6, e2869, 2014.

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

DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. **Current Pharmaceutical Design**, v.14, n.9, p.882-888, 2008.

DOYLE, P.S. et al. A nonazole CYP51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 2480–2488, 2010.

DOYLE, P.S. et al. The *Trypanosoma cruzi* Protease Cruzain Mediates Immune Evasion. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 9, e1002139, 2011.

DU, X. et al. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry & Biology**, v. 7, p. 733–742, 2000.

DU, X. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of potent trypanocidal thiosemicarbazone inhibitors of the trypanosomal cysteine protease cruzain. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DUBE, A.; GUPTA, R.; SINGH, N. Reporter genes facilitating discovery of drugs targeting protozoan parasites. **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 9, p. 432–439, 2009.

EKINS, S. et al. Machine Learning Models and Pathway Genome Data Base for *Trypanosoma cruzi* Drug Discovery. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 9, n. 6, 2015.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal disease of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 58-85, 2013.

FALEIRO, R.J. et al. Immune Regulation during Chronic Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n. 7, e2914, 2014.

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

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 28, n.11, p. 2758-70, 2011.

FIGUEIRAL, L.P. et al. Caracterização isoenzimática de isolados humanos de *Leishmania* sp (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) dos municípios de Rio Preto da Eva e Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 512-14, 2008.

FIGUEIREDO, R.C. et al. Reservosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. **Parasitology**, v. 129, n. 4, p. 431-438, 2000.

FRANÇA, R.R.F. et al. Inibidores potentes da enzima esteroide 14 α -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. **Revista Virtual em Química**, v. 6, p. 1483, 2014.

FREITAS-JUNIOR, L.H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012.

GIL, E.S. et al. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 29 p. 223-230, 2008.

GODOY, P. et al. Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 8, p. 1315–1530, 2013.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-49, 2004.

GRAEBIN, C.S. et al. Antiprotozoal agents: an overview. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 345-366, 2009.

GUHA, R. et al. Antimony Resistant *Leishmania donovani* but Not Sensitive Ones Drives Greater Frequency of Potent T-Regulatory Cells upon Interaction with Human PBMCs: Role of IL-10 and TGF- β in Early Immune Response. **PLoS Neglected Tropical Disease**, v. 8, n.7, e2995, 2014.

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. **Indian Journal Medical Research**, v. 133, p. 27-39, 2011.

HA, D.S. et al. Use of the green fluorescent protein as a marker in transfected *Leishmania*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 77, p. 57-64, 1996.

HABIBI, P. et al. Characterization of in Vitro Cultivated Amastigote like of *Leishmania major*: A Substitution for in Vivo Studies. **Iranian Journal of Parasitology**, v. 3, n. 1, p. 6-15, 2008.

HANDMAN, E. Cell biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, v. 44, p. 1-39, 2000.

HEMMIGE, V., TANOWITZ H., SETHI A. *Trypanosoma cruzi* infection: a review with emphasis on cutaneous manifestations. **International Journal of Dermatology**. v. 51, p. 501–508, 2012.

HEPBURN, N.C. Cutaneous leishmaniasis. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 25, p. 363–370, 2000.

HERNANDES, M.Z. et al. Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 7826–7835, 2010.

HOLLA, B.S. et al. Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 38, n. 3, p. 313-318, 2003.

HOTEZ, J. P.; SAVIOLI, L.; FENWICK, A. Neglected Tropical Diseases of the Middle East and North Africa: Review of Their Prevalence, Distribution, and Opportunities for Control. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, e1475, 2012a.

HOTEZ, J. et al. Chagas Disease: “The New HIV/AIDS of the Americas”. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, e1498, 2012b.

JACKSON, Y. et al, Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. **BMC Infectious Disease**, v. 13, p. 85, 2013.

KANELLOPOULOS, P. et al. Assessment of the infectivity potential of *Leishmania infantum*, using flow cytometry. **Experimental Parasitology**, v. 145, p. 29–33, 2014.

KHAN, S.A.; YUSUF, M. Synthesis, spectral studies and in vitro antibacterial activity of steroidal thiosemicarbazone and their palladium (Pd (II)) complexes. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 2270–2274, 2009.

KIEFFER, C. et al. Antileishmanial pharmacomodulation in 8-nitroquinolin-2(1H)-one series. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 10, p. 2377-86, 2015.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. **Leishmaniasis in the new world**. In: Collier L, Balows A, Sussman M, editors. *Topley & Wilson's Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed. London: E Arnold; p. 313-49, 2005.

LINDOSO J.A.L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, p. 69-77, 2012.

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

MAIA-ELKHOURY, A.N.S. Leishmaniose visceral no Brasil: evolução e desafios. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-7, 2008.

MARLOW, M.A. et al. Divergent Profile of Emerging Cutaneous Leishmaniasis in Subtropical Brazil: New Endemic Areas in the Southern Frontier. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, e56177, 2013.

MARTIN-PLAZA, J.J. AND CHATELAIN, E. Novel Therapeutic Approaches for Neglected Infectious Diseases. **Journal of Biomolecular Screening**. v. 20, p. 3-5, 2015.

MARTINS, A.V. et al. Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. **Revista de la Asociación Colombiana de Infectología**. v. 16, n. 1, p. 45-58, 2012.

MARTINS, J.P.A.; FERREIRA, M.M.C. QSAR Modeling: Um novo pacote computacional open source para gerar e validar modelos QSAR. **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 554-560, 2013.

MARTINS-MELO, F.R. et al. Mortality and Case Fatality Due to Visceral Leishmaniasis in Brazil: A Nationwide Analysis of Epidemiology, Trends and Spatial Patterns. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, e93770, 2014.

MATTOS, E.C. et al. Adhesion of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Fibronectin or Laminin Modifies Tubulin and Paraflagellar Rod Protein Phosphorylation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, 2012.

MARZOCHI, M.A.C.; MARZOCHI, K.B.F. Tegumentar and visceral leishmaniasis in Brazil. Emerging anthroponosis and possibilities for their control. **Caderno de Saúde Pública**, v. 10, supl. 2, p. 359- 75, 1994.

MCKERROW, J. H. et al. Proteases in parasitic diseases. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**. v. 1, p. 497-536, 2006.

MICHELS, P. A. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1763, n.12, p.1463–1477, 2006.

MONTE NETO, R.L. et al. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 215–21, 2011.

MONZOTE, L. et al. Chemistry, cytotoxicity and antileishmanial activity of the essential oil from *Piper auritum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 168-73, 2010.

MOREIRA, D.R.M. et al. Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-*Trypanosoma cruzi* compounds which induce apoptotic parasite death. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 75, p. 467-478, 2014a.

MOREIRA, D.R.M. et al. Structural design, synthesis and structure-activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti-*Trypanosoma cruzi* activity. **Chem Med Chem**, v. 9, n.1, p. 177-88, 2014b.

MOREIRA, R.C.R. et al. Efeito leishmanicida in vitro de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2007.

MOREIRA, T.L.B. et al. Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of *Trypanosoma Cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 183– 187, 2013.

MORENO, S. N., DOCAMPO, R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. **Journal Eukaryot Microbiology**, v.56, p. 208-213, 2009.

NAKAMURA, C.V. et al. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 16, n. 1, p. 61-6, 2006.

NAKAMURA, C.V., UEDA-NAKAMURA T., DE SOUZA W. Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. **FEMS Microbiology Letter**, v. 242, p. 227-230, 2005.

OLIVEIRA, M. F. et al. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, v. 37, n 3, p. 209-228, set. 2008.

OLIVEIRA, L.F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.

PADMINI, K. et al. Review on biological importance of hydrazones. **International Journal of Pharma Research & Review**, v. 2, n. 8, p. 43-58, 2013.

PALIT, P. et al. Discovery of safe and orally effective 4-aminoquinoline analogues as apoptotic inducers with activity against experimental visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 432–445, 2012.

PARSONS, M. Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 3, p. 717-24, 2004.

PEÑA, M. et al. New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource., **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

PEREIRA, L.H. et al. Activity of 9-acridanone-hydrazone drugs detected at the prepostural phase, in the experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 425-428, 1995.

PORTO-CARREIRO, I. et al. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes Endocytic pathway: cargo enters the Cytostome and passes through an early endosomal network before reservosome storage. **European Journal of Cell Biology**, v. 79, n. 11, p. 858-69, 2000.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 735, n. 9723, p. 1388-1402, 2010.

RIBEIRO, A.L. et al. Diagnosis and management of Chagas disease and cardiomyopathy. **Nature Reviews Cardiology**, v. 9, p. 576-589, 2012.

RICCIARDI, A.; NDAO, M. Diagnosis of Parasitic Infections: What's Going On? **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, n. 1, p. 6–2, 2015.

ROCHA, G.M. et al. Structural Changes of the Paraflagellar Rod during Flagellar Beating in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogenactivated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signalling and development? **Cellular Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 710-718, 2009.

SALOMÃO, K. et al. In vitro and in vivo activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazones derivatives of meglumine against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial and Agents Chemotherapy**, v. 54, p. 2023–2031, 2010.

SAMPAIO, R.N.R.; LUCAS, I.C.; COSTA FILHO, A.V. O uso da associação azitromicina e N-metil glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6. **Anais Brasileiro de Dermatologia**, v. 84, n. 2, p. 125-8, 2009.

SAMUELS, A.M. et al. Epidemiology of and Impact of Insecticide Spraying on Chagas Disease in Communities in the Bolivian Chaco. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, e2358, 2013.

SANDES, J.M. et al. 3-Hydroxy-2-methylene-3-(4-nitrophenylpropanenitrile): A new highly active compound against epimastigote and trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic Chemistry**, v. 38, p.190–195, 2010.

SANDES, J.M. et al. *Trypanosoma cruzi* Cell Death Induced by the Morita-Baylis-Hillman Adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile). **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, 2014.

SANTIAGO, E.F. et al. Evaluation of the Anti-*Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58 n. 1, p. 352-363, 2014.

SANTOS, T.A.B.; YOSHIOKA, M.K., MIYAGUI, M.L. Leishmaniose visceral. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 2, n. 25, p. 260, 2008.

SCHEIBEL, L.W. 2005. Antiprotozoários. In: CRAIG, C. R., STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna: com aplicações clínicas**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 572-585.

SECCI, D. et al. Synthesis, anti-*Candida* activity, and cytotoxicity of new (4-(4-iodophenyl) thiazol-2-yl) hydrazine derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 53, p. 246-53, 2012.

SCHNEIDER, A. Unique aspects of mitochondrial biogenesis in trypanosomatids. **Int J Parasitol**, v. 31, n. 13, p. 1403-15, 2001.

SERENO, D. et al. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitol. Int.**, v. 56, n. 1, p. 3-7, 2007.

SHANG, X. L. et al. Procyanidin induces apoptosis and necrosis of prostate cancer cell line PC-3 in a mitochondrion-dependent manner. **Journal Andrology**, v. 30, p. 122- 126, 2009.

SILVA, E.S.; CONTJO, C.M.F.; PACHECO, R.S.; FIÚZA, V.O.P.; BRAZIL, R.P. Visceral leishmaniasis in the metropolitan Region of Belo Horizonte, state of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 3, p. 285-91, 2000.

SILVEIRA, F.T.; CORBETT, C.E.P. *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, 1937: nativa ou introduzida? Uma breve revisão. **Rev Pan-Amaz Saúde**, v. 1, n. 2, p. 143-147, 2010.

SIQUEIRA-NETO, J.L. et al Antileishmanial High-Throughput Drug Screening Reveals Drug Candidates with New Scaffolds. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 4, n. 5, e675, 2010.

SIQUEIRA-NETO, J.L. et al. An Image-Based High-Content Screening Assay for Compounds Targeting Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes in Human Macrophages. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, e1671, 2012.

SOARES, R.O.A. et al. Evaluation of thiosemicarbazones and semicarbazones as potential agents anti-*Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 129, p. 381–387, 2011.

SOEIRO, MDE. et al. In Vitro and In Vivo Studies of the Anti-Parasitic Activity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Inhibitor VNI against Drug-Resistant Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 57, p. 4151–4163, 2013.

STOCKDALE L., NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, n. 6, e2278, 2013.

SUN R.B., XI Z.G, YAN J., YANG H.L. Cytotoxicity and apoptosis induction in human HepG2 hepatoma cells by decabromodiphenyl ethane. **Biomed. Environ. Sci.** v. 25, v. 5, p. 495–501, 2012.

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

TIUMAN, T.S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, p. e525–e532, 2011.

TURAN-ZITOUNI, G. et al. Synthesis and antituberculosis activity of new thiazolylhydrazone derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 43, p. 981-985, 2008.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Comparative analysis of megasomes in members of the *Leishmania mexicana* complex. **Research in Microbiology**, v.158, p.456-462, 2007.

UEDA-NAKAMURA, T.; ATTIAS, M.; DE SOUZA, W. Megasome biogenesis in *Leishmania amazonensis*: a morphometric and cytochemical study. **Parasitology Research**. v.87, n.2, p.89-97, 2001.

ULUSOY, N.; ÇAPAN, G.; ÖTÜK, G.; KIRAZ, M. Synthesis and antimicrobial activity of new 6- phenylimidazo[2,1-b]thiazole derivatives. **Boll. Chim. Farm.** v. 139, p. 167-172, 2000.

VANAERSCHOT, M. et al. Antimonial Resistance in *Leishmania donovani* Is Associated with Increased In Vivo Parasite Burden. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, e23120, 2011.

VANNIER-SANTOS, M. A.; DE CASTRO, S. L. Electron microscopy in antiparasitic chemotherapy: A (close) view to a kill. **Current Drug Targets**, v. 10, p. 246-260, 2009.

VERA, L.A. et al. Avaliação da influência da infecção bacteriana secundária na evolução da leishmaniose cutânea em Corte de Pedra, Bahia. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 34, n. 3, p. 233-7, 2001.

VERA, L.A. et al. Sensibilidade antimicrobiana de bactérias aeróbicas isoladas de úlceras leishmanióticas, em Corte de Pedra, BA. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 47-50, 2006.

VERMA, G. et al. A review exploring biological activities of hydrazones. **Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences**, v. 6, p. 69–80, 2014.

VIEIRA, P.M.D.A. et al. Different Infective Forms Trigger Distinct Immune Response in Experimental Chagas Disease. **PLoS ONE**. v. 7, n. 3, e32912, 2012.

WALCOURT, A. et al. Novel aroylhydrazone and thiosemicarbazone iron chelators with anti-malarial activity against chloroquine-resistant and -sensitive parasites. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v. 36, p. 401-407, 2004.

WANG, Y.; YANG, L.; LIU, Z. Synthesis and antibacterial activity of 5-(2-Hydroxyphenyl)-1,3,4-thiadiazol-2-yl-sulfanyl acetyl hydrazones. **Chinese Journal of Chemical**, v. 33, p. 154–8, 2013.

WIGGERS, H.J. et al. Non-peptidic Cruzain Inhibitors with Trypanocidal Activity Discovered by Virtual Screening and In Vitro Assay. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, e2370, 2013.

WILKINSON, S.R. et al. A mechanism for cross resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

ZANGGER, H. et al. Detection of *Leishmania* RNA Virus in *Leishmania* Parasites. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, e2006, 2013.

APÊNDICES



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>

Original article

2-Pyridyl thiazoles as novel anti-*Trypanosoma cruzi* agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation



Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso ^{a,*}, Lucianna Rabelo Pessoa de Siqueira ^a, Elany Barbosa da Silva ^a, Lívia Bandeira Costa ^a, Marcelo Zaldini Hernandez ^a, Marcelo Montenegro Rabello ^a, Rafaela Salgado Ferreira ^b, Luana Faria da Cruz ^b, Diogo Rodrigo Magalhães Moreira ^c, Valéria Rêgo Alves Pereira ^d, Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro ^d, Paul V. Bernhardt ^e, Ana Cristina Lima Leite ^a

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520 Recife, PE, Brazil

^b Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, CEP 31270-901 Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 40296-750 Salvador, BA, Brazil

^d Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, CEP 50670-420 Recife, PE, Brazil

^e School of Chemistry and Molecular Biosciences, University of Queensland, Brisbane 4072, Australia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 April 2014

Received in revised form

1 August 2014

Accepted 5 August 2014

Available online 6 August 2014

Keywords:

Chagas disease

Trypanosoma cruzi

Thiazoles

Hydrazones

2-Pyridine thiosemicarbazone

ABSTRACT

The present work reports on the synthesis, anti-*Trypanosoma cruzi* activities and docking studies of a novel series of 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles derived from 2-pyridine thiosemicarbazone. The majority of these compounds are potent cruzain inhibitors and showed excellent inhibition on the trypomastigote form of the parasite, and the resulting structure–activity relationships are discussed. Together, these data present a novel series of thiazolyl hydrazones with potential effects against Chagas disease and they could be important leads in continuing development against Chagas disease.

© 2014 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a potentially life-threatening illness caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) [1]. About 7–8 million people worldwide are estimated to be infected with *T. cruzi*, mainly in Latin America.

Over the years, numerous chemical classes against *T. cruzi* have become available, but there is still no effective treatment for all phases of the disease [2]. Recent research has pointed to the ergosterol biosynthetic pathway as a biochemical target [3,4]. Azole derivatives such as posaconazole and ravuconazole, have been tested and presented trypanocidal activity, but they are not yet available as therapeutics [5–7].

Despite the efforts of many investigators in the research of a new anti-Chagas drugs, only two drugs are currently used to treat

it, nifurtimox and benznidazole [6,8] (Fig. 1). Current chemotherapy for Chagas disease is unsatisfactory due to its limited efficacy, particularly in the chronic phase, with frequent side effects that can lead to discontinuation of treatment.

Among a number of drug targets being investigated for Chagas disease, cruzain, the major cysteine protease active in the parasite, is a prominent candidate [9–12]. Cruzain is a cathepsin-L-like protease of the papain family thought to be important for intracellular replication and differentiation of the *T. cruzi* parasite [13]. Among the chemical groups explored for anti-Chagas activity, thiazolyl hydrazones are noteworthy because of their wide biological, especially anti-parasitic, activities [14–17].

In 2004, Greenbaum et al. observed that thiosemicarbazones with a pyridyl moiety inhibit cruzain catalytic activity [18]. Subsequent studies have demonstrated the trypanocidal activity of thiosemicarbazones and their metal complexes. Recently, Caputo et al. have demonstrated trypanocidal activity for a series of 4-arylthiazolylhydrazones [19], with a broad and potent activity for all forms of the parasite. Recently studies have reported inhibition

* Corresponding author.

E-mail address: marcosvocardoso@gmail.com (M.V.O. Cardoso).

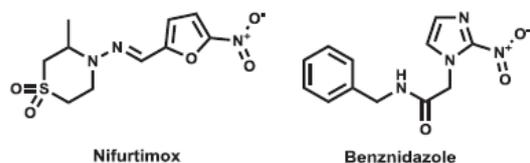


Fig. 1. Structures of nifurtimox and benznidazole.

of the cysteine protease cruzain by thiosemicarbazones [16]. Our efforts toward new antichagasic drug since 2010 have led us to a variety of thiosemicarbazones and thiazolyl hydrazones as trypanocidal agents [16,19–22]. The promising results achieved by compounds bearing a thiazole ring motivated us to investigate the trypanocidal activity of novel thiazolyl hydrazones derived from 2-pyridyl thiosemicarbazone, with changes being made in the phenyl ring attached in N2. In continuation of our search for bioactive molecules, we envisaged that the derivatization of the thiosemicarbazone group into thiazole moiety would generate novel templates, which are likely to exhibit anti-*T. cruzi* activity. We also investigate pyridines as trypanocidal agents because their wide applicability in organic synthesis, low price and facility in synthesis. Here, these compounds were tested *in vitro* against *T. cruzi* parasite epimastigote and trypomastigote forms, and cruzain protease. In this synthetic design of a structure–activity relationship (SAR) library, attention was paid to further explore substituents around the phenyl ring attached in thiazole ring (C9). This study generated basic SARs about tripomastigote form and cruzain enzyme around substituents in phenyl ring, and using the scaffold shown in Scheme 1. Specifically, we report the preparation of twenty-four 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles (3–26) by ultrasound-assisted synthesis. The synthesized compounds were characterized by IR, NMR and mass spectral studies. The 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles were assayed for their *in vitro* anti-*T. cruzi* activity against the epimastigote and trypomastigote forms of the parasite. Their cytotoxicity in mammalian cell cultures was also investigated. Further investigations on the possible involvement of 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles with cruzain activity as potential therapeutic targets were performed.

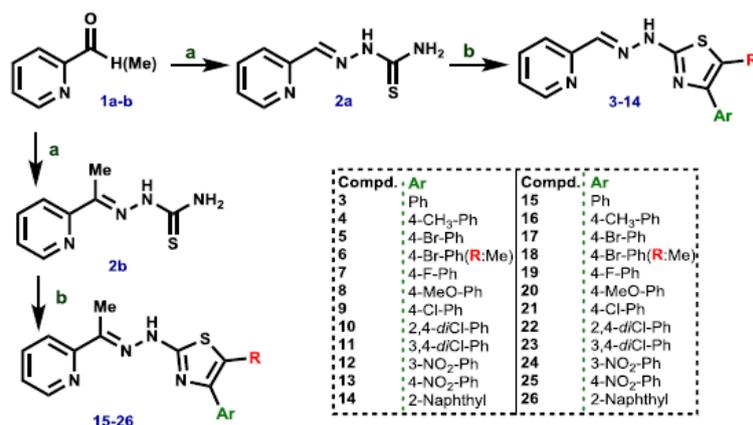
2. Results and discussion

2.1. Chemistry

2-(pyridin-2-yl)thiosemicarbazones (2a–b) were prepared by reacting commercially available thiosemicarbazides with the appropriate aldehyde or ketone (1:1.2 mol ratio) via Schiff base condensations using ultrasound irradiation in presence of a catalytic amount of AcOH. This reaction condition led to high yields (80–90%). 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles (3–26) were prepared via Hantzsch cyclization between 2-(pyridin-2-yl)thiosemicarbazones (2a–b) and substituted 2-bromoacetophenones (Scheme 1). These reactions proceed well upon refluxing with ethanol (2–4 h), but here we adapted this to ultrasound conditions at room temperature [23] using 2-propanol as solvent [24]. This resulted in good yields (50–85%) and shorter reaction times (60 min in most cases) compared with the reflux protocol.

Microanalysis and NMR data are compatible with the proposed compounds. In theory, two geometrical isomers (*E* and *Z*) about the imine (C=N) double bond are possible for the thiosemicarbazones. However, analysis of the ¹H NMR spectra of the target compound indicated one predominant isomer; the *E* isomer by comparison with known analogues [25]. Intramolecular H-bonding involving the proton attached to N4 (in DMSO) with the imine N-atom leads to a distinctive singlet around 10.2 ppm [25] and this is also seen here.

Once thiosemicarbazones were characterized, the respective 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles were characterized by usual spectroscopy. As exemplified with the ¹H NMR analysis of (2-(1-(pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-phenyl-1,3-thiazole (15), the singlet peak at δ 2.43 corresponds to the methyl group. The aromatic protons occurred as doublets or triplets. For the pyridyl ring, peaks were observed at δ 7.76, 8.23, 8.35 and 8.73. For the aromatic ring coupled to the thiazole ring, doublet and triplet peaks were found at δ 7.30, 7.39 and 7.85. For the thiazole ring, a singlet at δ 7.44 was found. In addition, the NH proton appeared as broad singlet at δ 5.53. The ¹³C NMR spectrum of (15) the ¹³C=S resonance from the parent thiosemicarbazone disappeared while a new ¹³C–H resonance at ~106 ppm appeared, confirming cyclization in addition to the resonance at ~169 ppm. Quaternary carbon peaks were confirmed by DEPT experiments to appear at δ 134.2, 140.1, 150.0 and 168.9. Peaks of the pyridine aromatic carbons were found at



Scheme 1. Synthetic procedures for thiosemicarbazones (2a–b) and 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles (3–26). Reagents and conditions: (a) thiosemicarbazide, 2-propanol, acetic acid (3 drops), ultrasound irradiation, r.t., 120 min; (b) substituted 2-bromoacetophenones, 2-propanol, CaCO₃, ultrasound irradiation, r.t., 60 min; *R: H for all compounds, except to (6) and (18) where R: Me.

50

M.V.O. Cardoso et al. / European Journal of Medicinal Chemistry 86 (2014) 48–59

δ 123.6, 125.6, 143.9, 147.5, and 150.0. Resonances from the phenyl ring coupled to the thiazole ring were observed at δ 126.0, 128.4, 129.2 and 134.2. A combination of elemental analysis (C, H, N), UV, IR and HRMS confirmed the purity and identity of all the compounds.

2.2. X-ray crystallography

The X-ray crystal structure of 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-tolyl)-1,3-thiazole (**4**) is shown in Fig. 2. Crystal and refinement data are summarized in Table 1. The dihedral angles C(11)–C(10)–C(9)–N(4), C(9)–N(4)–C(7)–N(3), C(7)–N(3)–N(2)–C(6), N(2)–C(6)–C(5)–C(4) and C(16)–C(13)–C(12)–C(11) of -177.84° , -179.48° , -176.60° , -176.54° and 178.43° respectively indicate that the molecule is close to planar. In the thiazole ring, two significantly different C–N bonds are found viz. C9–N4 (1.373(4) Å) and C7=N4 (1.265(5) Å) and C8=C9 is clearly a double bond (1.348(5) Å). It is apparent that compound (**4**) crystallises in the Z-isomeric form where intramolecular H-bonding with the pyridyl ring and the proton attached to N2 is seen (see Fig. 2). In this case, the E-isomer cannot be stabilised by H-bonding due to the loss of the proton from N⁴ of the parent thiosemicarbazone.

2.3. Structure–activity relationships (SAR)

To investigate the importance of substituents on the phenyl ring for the antiparasitic activity against trypanosome form, compound (**3**) (without substituents) was compared with seven *para* substituted analogues. It was found that compounds (**5**), (**6**), (**8**) and (**9**) showed better anti-*T. cruzi* activity than (**3**), while compounds (**4**), (**7**) and (**13**) were less potent (see Table 2). For the chloro substituted compounds (**9**–**11**), it was observed that the dichloro compounds (**10** and **11**) were equally trypanocidal, being 3-fold more potent than 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole (**9**). The monobromo compounds (**5**) and (**6**) displayed activity intermediate of the mono and dichloro compounds. The presence of a methyl group attached to C8 (for compound **5**) did not significantly affect biological activity.

Comparing compound (**14**) with (**3**) (naphthyl and aryl, respectively), it was observed that the influence of a more bulky substituent increased the trypanocidal activity, probably because of an increase in lipophilicity. For the nitro compounds (**12**) and (**13**), the position of the substituent affected trypanocidal activity. For compound (**12**), (*meta* substituted), a 2-fold increase in activity was found relative to (**13**) (*para* substituted).

Compounds (**15**) to (**26**) (derived from 2-acetyl pyridine) differed from compounds (**3**) to (**14**) (derived from 2-pyridine carbaldehyde) by a methyl group present in C6 (Scheme 1). Analysis of the activity of these compounds suggests a trend in which a

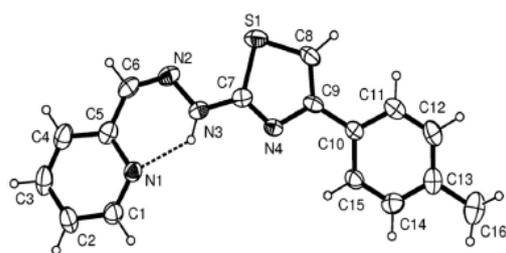


Fig. 2. ORTEP view of compound (**4**) showing intramolecular H-bonding (30% probability ellipsoids are shown).

Table 1
Crystal data and structure refinement for compound (**4**).

Empirical formula	C ₁₆ H ₁₄ N ₄ S
Formula weight	294.37
Temperature (K)	296(2)
Wavelength (Å)	0.71073
Crystal system	Orthorhombic
Space group	Pna2 ₁
Unit cell dimensions	
a (Å)	9.858(1)
b (Å)	25.602(3)
c (Å)	5.5127(6)
Volume (Å ³)	1391.3(3)
Z	4
ρ_{calc} (g cm ⁻³)	1.405
μ (mm ⁻¹)	0.231
F(000)	616
Crystal size (mm)	0.6 × 0.1 × 0.1
θ range (°)	3.2–25.0
Reflections collected	5864
Independent reflections	2635
Observed reflections [$I > 2\sigma(I)$]	1489
R_{int}	0.0590
Refinement method	Full-matrix least-squares on F ²
Data/restraints/parameters	2635/1/191
Goodness-of-fit on F ²	0.997
R [$I > 2\sigma(I)$]	0.0580
wR ₂ (all data)	0.0871
Absolute structure parameter	–0.03(11)
Residual extrema (e Å ⁻³)	0.183 and –0.144
CCDC number	980106

methyl in C6 increases the trypanocidal activity. Compounds (**15**)–(**26**) stand out, show high trypanocidal activity (trypanosome form); with exception of (**25**), all compounds are more potent than reference drug benznidazole.

Table 2
Anti-*T. cruzi* activities of acetylpyridin-2-yl thiosemicarbazone (**2a**) and 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles (**3**–**14**).

Compd.	Ar	Y strain <i>T. cruzi</i> , IC ₅₀ (μM)		HepG2, IC ₅₀
		Trypomastigotes ^a	Epimastigotes ^b	(μM) ^c
2a	–	17.3	119.5	ND
3	Ph	5.4	8.3	100
4	4-CH ₃ Ph	16.8	3.8	100
5	4-BrPh	2.2	2.2	100
6	4-BrPh ^d	2.6	18.3	100
7	4-FPh	72.7	3.5	18.20
8	4-CH ₃ OPh	4.8	5.6	100
9	4-ClPh	3.8	3.8	100
10	2,4-diClPh	1.2	4.8	100
11	3,4-diClPh	1.2	4	100
12	3-NO ₂ Ph	74.2	2.5	100
13	4-NO ₂ Ph	152.9	4.4	100
14	2-Naphthyl	2.1	8.3	100
Bdz	–	6.2	6.6	ND

^a Determined 24 h after incubation of trypomastigotes with the compounds.

^b Determined 11 days after incubation of epimastigotes with the compounds. IC₅₀ was calculated from at least five concentrations, in triplicate (SD < 10%).

^c IC₅₀ determined for human HepG2 after 48 h of incubation in the presence of the compounds.

^d R: methyl, see Scheme 1. Bdz: benznidazole. ND: not determined.

Table 3
Anti *T. cruzi* Activities of acetylpyridin-2-yl thiosemicarbazone (**2b**) and 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles (**15–26**).

Compd.	Ar	Y strain <i>T. cruzi</i> , IC ₅₀ (μM)		HepG2, IC ₅₀ (μM) ^f
		Trypomastigotes ^a	Epimastigotes ^b	
2b	—	2.8	4.5	ND
15	Ph	1.1	2.7	91.20
16	4-CH ₃ Ph	1.7	2.5	100
17	4-BrPh	2.1	2.1	100
18	4-BrPh ^d	2.3	2.3	85.11
19	4-FPh	3.8	2.8	91.20
20	4-CH ₃ OPh	2.1	14.7	100
21	4-ClPh	2.1	2.5	100
22	2,4-dClPh	1.9	14.9	100
23	3,4-dClPh	3.1	5.0	100
24	3-NO ₂ Ph	3.9	2.4	100
25	4-NO ₂ Ph	36.7	5.2	100
26	2-Naphthyl	2.0	4.1	100
Bdz	—	6.2	6.6	ND

^a Determined 24 h after incubation of trypomastigotes with the compounds.
^b Determined 11 days after incubation of epimastigotes with the compounds. IC₅₀ was calculated from at least five concentrations, in triplicate (SD < 10%).
^c IC₅₀ determined for human HepG2 after 48 h of incubation in the presence of the compounds.
^d R: methyl, see Scheme 1. Bdz: benznidazole. Percentage of inhibition is the average of triplicate runs determined in one experiment. ND: not determined.

The *para* substituted 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles (**16–21** and **25**) were less active than unsubstituted 2-(1-(pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl-4-phenyl-1,3-thiazole (**15**), which was the most potent compound tested in this work. No correlation was observed between the electron withdrawing properties of the substituent and trypanocidal activity.

For the isomeric dichloro compounds (**22**) and (**23**), we observed little change in trypanocidal activity. For the nitro compounds (**24** and **25**), the compound *meta* substituted (**24**) was 9-fold more potent than *para* substituted (**25**), (3.9 μM vs 36.7 μM respectively).

From Table 3, it can be seen that 2-(pyridin-2-yl)ethylene-1,3-thiazoles (**15–26**) (with a methyl attached to C6), had increased the trypanocidal activity for both trypomastigote and epimastigote in comparison with 2-(pyridin-2-yl)methylene-1,3-thiazoles (**3–14**).

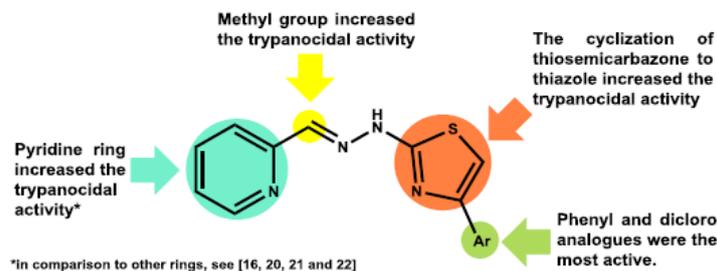


Fig. 3. Summary of SAR of trypanocidal activity for compounds (**3–26**).

Comparing compounds with nitro substituents across the (**3–14**) and (**15–26**) series, the biggest difference was observed for compounds (**13/25**) (*meta* substituted), with 3.9 μM against 74.2 μM and (**12/25**), *para* substituted, with 36.7 μM against 152.9 μM.

Among all of the compounds in this work, the most potent were (**10**), (**11**) and (**15**). It should be noted that among twenty-four compounds designed for anti-Chagas activity, twenty compounds (**3**, **5**, **6**, **8–11**, **14**, **15–24** and **26**) displayed better trypanocidal activity than benznidazole.

Analysing the antiparasitic activity against epimastigote form, benznidazole, which is the reference drug, exhibited an IC₅₀ of 6.6 μM. Once again, the majority of derivatives were very active. In this case, only compounds (**6**), (**20**) and (**22**) were several times less potent than benznidazole. In contrast, compounds (**5**), (**12**), (**15**)–(**19**) and (**21**) displayed a better activity profile than benznidazole-treated parasites.

A recent work describing 2-imino-1,3-thiazoles [16] (derivatives **26–46**), that share an aryloxypropylimine instead of a pyridine ring, displayed lower trypanocidal effects when compared to these that possess a 2-pyridyl moiety, pointing out the importance of the 2-pyridyl moiety for the trypanocidal activity. Fig. 3 summarizes the main SAR for anti *T. cruzi* activity (trypomastigote form).

2.4. Cruzain inhibition activity

Table 4 shows the inhibition of the enzyme cruzain of *T. cruzi* (TCC). The experimental protocol described by Ferreira [26] was utilized in this assay. All compounds were tested at a concentration of 100 μM, except for cases limited by solubility, in which the screening was performed at either 50 or 75 μM (as noted on Table 4). Compounds which inhibited enzyme activity by at least 70% in the screening had their IC₅₀ determined.

Some works describe that 2-imino-1,3-thiazoles are trypanocidal agents by altering the ergosterol biosynthesis instead of inhibiting the catalytic activity of cruzain [16,19]. In this work we show that cruzain is potently inhibited by several compounds.

Among all compounds tested, the most actives were (**20**) and (**26**), showing the lowest IC₅₀ values (0.04 ± 0.03 μM and 0.01 μM, respectively). Due to the low potency of some compounds and the absence of IC₅₀ values, in some cases we made a discussion based in percentual inhibition of cruzain.

Comparing *para* substituted compounds; the most active were (**20**), (**16**), (**19**) and (**5**), showing percentage of inhibition near 90%. For the dichloro compounds (**10–11**), 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (**10**) did not show any inhibition of cruzain, in contrast to 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (**11**), which displayed weak inhibition. For the nitro compounds (**12–13**),

52

M.V.O. Cardoso et al. / European Journal of Medicinal Chemistry 86 (2014) 48–59

the positional change of the nitro group from *para* to *meta* had a huge impact on potency against cruzain: while the 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3-nitrophenyl)-1,3-thiazole (12) shows $IC_{50} = 1.3 \pm 0.7 \mu M$, 2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-nitrophenyl)-1,3-thiazole (13) does not considerably inhibit the enzyme at 100 μM .

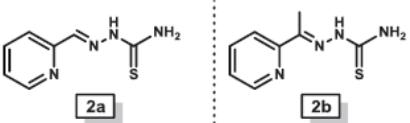
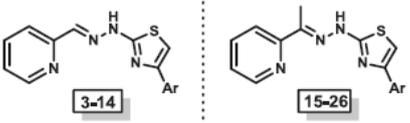
To investigate the relative activity of thiosemicarbazone vs thiazole in cruzain inhibition, compounds (2a) and (3) were compared. Neither of these compounds inhibits the enzyme at the concentrations evaluated, but (15), an analogue of (3) differing only by the addition of a methyl group at C6 was shown to be a moderately potent inhibitor $IC_{50} = 1.3 \pm 0.7 \mu M$. Extrapolating the

analysis by comparison of compounds (3–14) to compounds (15–26), which show an analogous difference, we observe that in seven cases the addition of the methyl considerably improved cruzain inhibition, while only for two compound pairs (5 vs 17 and 12 vs 24) the opposite effect was observed. Together, these results indicate the high importance of the methyl group at C6.

Within the series (15–26), seven compounds had their IC_{50} values determined, and in five cases the potency was better than 0.5 μM . Among the *para* substituted compounds, (16) and (19) had very similar potencies. On the other hand, modifying the methyl substituent (16) to methoxy (20) increased the potency by an order of magnitude.

For chlorine substituted compounds (21–23), the pattern of substitution had a big impact on potency. While the *para* substituted compound was inactive, disubstituted compounds were cruzain inhibitors, and the 3,4-*diCl* compound (23) was 12 fold more potent than the 2,4-*diCl* (22). Comparing the isomeric nitro-compounds (*meta* (24) and *para* (25) substituted), no significant cruzain inhibition was observed.

Table 4
Comparison of *in vitro* cruzain inhibition activity of compounds (2a–2b) and (3–26).

Compd.	Ar	% Cruzain inhibition at 100 μM^a	IC_{50} (μM) ^d
			
2a		1 ± 2	ND
2b		5 ± 5	ND
			
3	Ph	9 ± 1 ^b	ND
15	Ph	93 ± 3	1.3 ± 0.7
4	4-CH ₃ Ph	23 ± 2	ND
16	4-CH ₃ Ph	90 ± 4	0.4 ± 0.2
5	4-BrPh	86 ± 6	9.5 ± 7.5
17	4-BrPh	-8 ± 2	ND
6	4-BrPh ^c	10 ± 4	ND
18	4-BrPh ^c	27 ± 3	ND
7	4-FPh	22 ± 3 ^c	ND
19	4-FPh	89 ± 5	0.3 ± 0.2
8	4-CH ₃ OPh	20 ± 1 ^b	ND
20	4-CH ₃ OPh	95 ± 2	0.04 ± 0.03
9	4-ClPh	-1 ± 4 ^b	ND
21	4-ClPh	-3 ± 1	ND
10	2,4- <i>diCl</i> Ph	0 ± 3 ^b	ND
22	2,4- <i>diCl</i> Ph	81 ± 7	4.8 ± 3.8
11	3,4- <i>diCl</i> Ph	21 ± 9	ND
23	3,4- <i>diCl</i> Ph	89 ± 4	0.4 ± 0.1
12	3-NO ₂ Ph	85 ± 2	1.3 ± 0.7
24	3-NO ₂ Ph	10 ± 5 ^b	ND
13	4-NO ₂ Ph	12 ± 3	ND
25	4-NO ₂ Ph	11 ± 5 ^b	ND
14	2-Naphthyl	3 ± 1	ND
26	2-Naphthyl	94 ± 3	0.01

^a Values correspond to the average of six measurements, from two independent experiments, each one in triplicate. Errors are given by the ration between the standard deviation and the square root of the number of measurements. Compounds evaluated at 100 μM unless otherwise noted.

^b Compounds evaluated at 75 μM .

^c Compounds evaluated at 50 μM .

^d IC_{50} curves were determined based two independent experiments, each one involving at least seven compound concentrations in triplicates.

^e R: methyl, see Scheme 1. ND: not determined.

2.5. Cytotoxicity activity

To determine the toxicity profile of the compounds, cytotoxicity assay adapted from Ballell et al. [27] were performed with HepG2 cells, a human liver cell line commonly used for *in vitro* testing of toxicity [28]. Cells were incubated with the compounds at concentration of 100 μM for 48 h. It is worth mentioning that a compound that can kill parasites is necessary but not sufficient to represent a good drug lead unless it also demonstrates low or non-toxicity among other criteria. As can be observed in Tables 2 and 3, only compound (7) (a fluorine derivative) exhibited toxicity for HepG2 (18.20 μM). The most of compounds were less cytotoxic for HepG2 at concentrations up to 85.11 μM , demonstrating the low toxicity profile of the compounds assayed.

2.6. Docking studies

In order to understand a probable mechanism of action, we investigated the interaction of these compounds with cruzain (PDB ID: 3IUT) by docking studies. The binding mode for the ligands was determined as the highest (most positive) score among the possible solutions for each ligand, generated according to the CHEMPLP Score Function [29]. Fig. 4 shows the superposition of the best

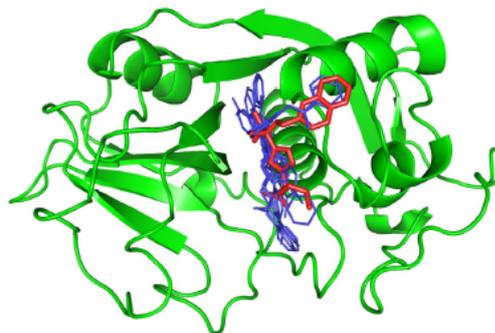


Fig. 4. Superposition of the docking solutions for cruzain-inhibiting compounds (5), (12), (15), (16), (19), (20), (22), (23) and (26) (blue structures) bound to cruzain (green) and the crystallographic structure of the "KB2" co-crystallized ligand [30] (red structure). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

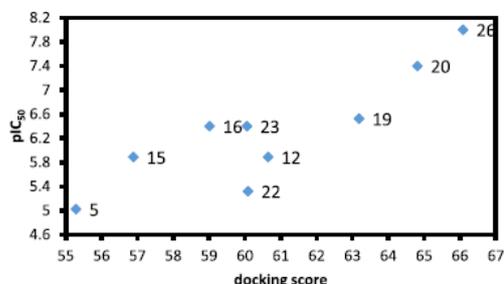


Fig. 5. Trend observed between the *in vitro* (pIC_{50} for cruzain inhibition) and *in silico* (docking score) results, for compounds (5), (12), (15), (16), (19), (20), (22), (23) and (26).

docking solutions for compounds that have IC_{50} values experimentally determined for cruzain (5, 12, 15, 16, 19, 20, 22, 23, 26) and the crystallographic structure of the "KB2", a high-efficient cruzain inhibitor cocrystallized ligand [30]. To compare *in silico* vs *in vitro* cruzain data, IC_{50} values were first converted into pIC_{50} values (equals $-\log_{10}IC_{50}$ for cruzain inhibition, in units of moles per litre).

Fig. 5 shows the trend between the calculated docking scores and the experimental pIC_{50} data, which indicates the compounds with the highest pIC_{50} being most active. There is a clear correlation between the docking score and pIC_{50} supporting the hypothesis that the most tightly binding thiazoles are also the most potent cruzain inhibitors (i.e., greater *in vitro* pIC_{50} values).

To identify the molecular reasons for the two extremes of potency, the highest (26) ($IC_{50} = 0.01$ nM) and lowest (5) ($IC_{50} = 9.5$ nM) *in vitro* results, we performed a detailed analysis of the intermolecular interactions with the cruzain target. The principle structural differences between these two molecules are as follows: (i) the presence of a 4-bromophenyl ring linked to the thiazole ring in molecule (5), instead of a naphthalene group in molecule (26); (ii) a methyl group on C6 (adjacent to the pyridyl ring) for molecule (26), rather than hydrogen for molecule (5).

The difference between the binding modes of these two molecules is shown in detail in Fig. 6 and Table 5. It appears that the large hydrophobic naphthalene group in molecule (26) provides a greater contact surface for interactions with hydrophobic residues LEU67, MET68, ALA138 and LEU160 in the S2 cruzain subsite, which

is known to accommodate hydrophobic groups. Compared with the bromophenyl group in (5). The hydrogen bond with the residue ASP161 is slightly shorter for the molecule (26) (2.5 Å) than for molecule (5) (2.8 Å). There is also a weak hydrogen bond with the CYS25 residue (3.4 Å). These findings imbue greater stability to the complex formed with (26) than (5), with docking scores of 66.09 and 55.29, respectively. These findings corroborate the *in vitro* binding assay with the cruzain enzyme.

3. Conclusion

The current investigation has revealed novel structure–activity relationships regarding aromatic substitution at the phenyl moiety of 2-(pyridin-2-yl)-1,3-thiazoles for the design of new drugs for the treatment of Chagas disease. The novel analogues (3–26) exhibited improved trypanocidal activity than thiosemicarbazones (2a–b), while showing a similar potency to standard drug in use for treatment of Chagas disease, Benznidazole.

Compounds (10) and (11) were the most potent thiazoles with IC_{50} values of 1.2 μ M for each compound. In addition, all of the novel thiazoles showed similar or greater trypanocidal efficacy than Benznidazole, with compounds (10) and (11) exhibiting highest efficacies overall.

Structure–activity analysis did not reveal a correlation between ligands with electron-donating or electron-withdrawing substituents in terms of trypanocidal activity. However, the *in silico* docking studies corroborate with *in vitro* cruzain inhibition, showing that the molecules with more stable or positive docking scores (i.e., greater *in silico* affinity for cruzain) are also the most potent cruzain inhibitors (i.e., greater *in vitro* pIC_{50} values).

4. Experimental section

4.1. Equipment and reagents

All reagents were used as purchased from commercial sources (Sigma–Aldrich, Acros Organics, Vetec or Fluka). Progress of the reactions was followed by thin-layer chromatography (TLC) analysis (Merck, silica gel 60 F₂₅₄ in aluminium foil). Purity of the target compounds was confirmed by combustion analysis (for C, H, N, S) performed by a Carlo-Erba instrument (model EA 1110). Melting points were determined on a Fisatom 430D electrothermal capillary melting point apparatus and were uncorrected. NMR spectra were measured on either a Varian UnityPlus 400 MHz (400 MHz for

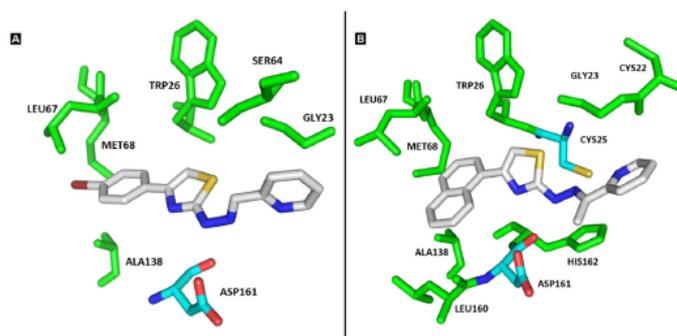


Fig. 6. Detailed view of the docking solutions for (A) compound (5) and (B) compound (26). Hydrophobic interactions (green) and hydrogen bonds (cyan). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 5
Docking scores and molecular interactions between cruzain and molecules (5) and (26).^a

Cruzain residues	Molecules	
	5	26
CYS22	–	HC
GLY23	HC	HC
CYS25	–	3.4
TRP26	HC	HC
SER64	HC	–
LEU67	HC	HC
MET68	HC	HC
ALA138	HC	HC
LEU160	–	HC
ASP161	2.8	2.5
HIS162	–	HC
SCORES	55.29	66.09

^a HC means "hydrophobic contacts" and the numbers are the hydrogen bond distances, in Ångströms.

¹H and 100 MHz for ¹³C) or a Bruker AMX-300 MHz (300 MHz for ¹H and 75.5 MHz for ¹³C) instruments. DMSO-*d*₆ and D₂O were purchased from CIL or Sigma–Aldrich. Chemical shifts are reported in ppm and multiplicities are given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), dd (double doublet), and coupling constants (*J*) in hertz. Mass spectrometry experiments were performed on a LC-IT-TOF (Shimadzu). Unless otherwise specified, ESI was carried out in the positive ion mode. Typical conditions were: capillary voltage of 3 kV and cone voltage of 30 V, and peak scan between 50 and 1000 *m/z*. IR spectra were recorded with a Bruker model IFS66 FT-IR spectrophotometer using KBr pellets.

4.2. Crystallography

Crystallographic data were collected on an Oxford Diffraction Gemini S Ultra CCD diffractometer at 296 K using MoK α radiation ($2\theta_{\max} = 50^\circ$). Data reduction and empirical absorption corrections were carried out with the CrysAlis Pro program (Oxford Diffraction vs 171.33.42). The structure was solved by direct methods with SHELXS86 and refined with SHELXL97 [31]. All non-H-atoms were refined anisotropically and H-atoms were constrained at their estimated positions using a riding model. The thermal ellipsoid diagram was generated with ORTEP3 [32]. All crystallographic calculations were carried out within the WinGX graphical user interface [33]. Crystallographic data of compound (4) have been deposited with the Cambridge Crystallographic Data Centre as supplementary publication CCDC 980106. These data can be obtained free of charge from The Cambridge Crystallographic Data Centre ((Cambridge, UK) via www.ccdc.cam.ac.uk).

4.3. General modified procedure for the synthesis of known thiosemicarbazones (2a–b)

To a solution of 2-pyridine carbaldehyde (0.75 g, 7 mmol) (or acetyl-2-pyridine (0.85 g, 7 mmol)) in 2-propanol (10 mL) was added thiosemicarbazide (0.64 g, 7 mmol) and few drops of acetic acid. The reaction vessel was placed in an ultrasonic bath (40 MHz, 180 V) and irradiated for 120 min, at r.t. The precipitate was filtered off, washed with hexane then dried in desiccator under vacuum. Additional amount of desired compound could be recovered from the filtrate after cooling.

4.3.1. 2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (2a)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, yield: 91%. m.p. (°C): 167. IR (KBr): (C=C), 1606 (C=N), (N–H)

cm^{-1} . ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 7.35 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, Ar), 7.81 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 8.09 (s, 1H, CH), 8.16 (broad s, 1H, NH₂), 8.26 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.35 (broad s, 1H, NH₂), 8.55 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, Ar), 11.63 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 120.2 (C, Ar), 124.0 (C, Ar), 136.5 (C, Ar), 142.5 (C=N), 149.2 (C, Ar), 153.3 (C, Ar), 178.3 (C=S, Ar). Anal. Calcd for C₇H₈N₄S: C, 46.65; H, 4.47; N, 31.09; S, 17.79; found: C, 46.58; H, 4.50; N, 31.12; S, 17.71. HR-MS (ESI): 181.6730 [M+H]⁺.

4.3.2. 2-[1-(2-Pyridinyl)ethylidene]hydrazinecarbothioamide (2b)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 86%, m.p. (°C): 170. IR (KBr, cm^{-1}): 1553 (C=C), 1612 (C=N), 3066 (N–H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.37 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, Ar), 7.77 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 8.12 (broad s, 1H, NH₂), 8.37 (broad s, 1H, NH₂), 8.41 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 8.56 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, Ar), 10.30 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.12 (CH₃), 120.9 (C, Ar), 123.9 (C, Ar), 136.5 (C, Ar), 148.1 (C=N), 154.6 (C, Ar), 179.1 (C=S); Anal. Calcd for C₈H₁₀N₄S: C, 49.46; H, 5.19; N, 28.84; S, 16.51; found: C, 49.42; H, 5.21; N, 28.79; S, 16.56. HR-MS (ESI): 195.0682 [M+H]⁺.

4.4. General procedure for the synthesis of (3–26). Example for compound (3)

2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinecarbothioamide (2a) (0.5 g, 2.78 mmol) was dissolved in 2-propanol (10 mL) and then the appropriate 2-bromoacetophenone (see Scheme 1) (0.79 g, 3.05 mmol) and calcium carbonate (0.42 g, 3.05 mmol) were added to a glass tube. The tube was placed in an ultrasonic bath (40 MHz, 180 V) and irradiated for 60 min, at r.t. Hexane was added and the mixture was cooled in a freezer overnight. The precipitate was filtered off and washed with hexane then dried in a desiccator under vacuum. Additional amount of the desired compound were obtained from the filtrate after cooling. Pure products were obtained after recrystallization using the solvent system detailed below for each compound.

4.4.1. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-phenyl-1,3-thiazole (3)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals. Yield: 86%, m.p. (°C): 170. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 4.47 (broad s, 1H, NH), 7.31 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar), 7.38–7.52 (m, 4H, 3H of Ar and 1H for CH of thiazole), 7.41 (t, *J* = 7.3 Hz, 2H, Ar), 7.49 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H, Ar), 7.86 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.97 (t, *J* = 9.2 Hz, 1H, Ar), 8.10 (s, 1H, CH), 8.62 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 104.5 (S–CH), 120.0 (C, Ar), 124.0 (C, Ar), 125.5 (C, Ar), 127.6 (C, Ar), 128.7 (C, Ar), 139.2 (C, Ar), 147.7 (C, Ar), 150.6 (C, Ar), 151.8 (C=N), 167.5 (S–C=N). IR (KBr, cm^{-1}): 1553 (C=C), 1612 (C=N), 3066 (N–H) cm^{-1} . Anal. Calcd for C₁₅H₁₂N₄S: C, 64.26; H, 4.31; N, 19.98; S, 11.44; Found: C, 64.22; H, 4.38; N, 20.02; S, 11.42. HR-MS (ESI): 281.0842 [M+H]⁺.

4.4.2. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-tolyl)-1,3-thiazole (4)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded dark red crystals, Yield: 79%, m.p. (°C): 197. IR (KBr, cm^{-1}): 1554 (C=N), 1612 (C=N), 3154 (N–H) cm^{-1} . ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.32 (s, 3H, CH₃), 7.21 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar), 7.29 (s, 1H, CH of thiazole), 7.36 (t, 1H, *J* = 7.4 Hz, Ar), 7.50 (broad s, 1H, NH), 7.75 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.84 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 7.86 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 8.06 (s, 1H, CH), 8.57 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 20.8 (CH₃), 104.0 (S–CH), 119.1 (C, Ar), 123.6 (C, Ar), 125.5 (C, Ar), 125.7 (C, Ar), 129.2 (C, Ar), 131.9 (C, Ar), 136.7 (C, Ar), 141.4 (C, Ar), 149.5 (Ar), 153.2 (C=N), 167.7 (S–C=N); Anal.

Calcd for $C_{16}H_{14}N_4S$: C, 65.28; H, 4.79; N, 19.03; S, 10.89; found: C, 65.26; H, 4.82; N, 19.09; S, 10.84. HR-MS (ESI): 295.0991 [M+H]⁺.

4.4.3. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (5)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 74%, m.p. (°C): 205. IR (KBr, cm^{-1}): 1569 (C=N), 1574 (C=N), 3151 (N-H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 3.42 (s, 1H, NH), 7.29 (s, 1H, CH of thiazole), 7.36 (t, *J* = 6.6 Hz, 1H, Ar), 7.45 (s, 1H, CH), 7.59 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar), 7.74 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 7.80 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar), 7.86 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 8.06 (d, *J* = 7.1 Hz, 1H), 8.57 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 105.6 (S-CH), 119.7 (C, Ar), 121.1 (C, Ar), 127.1 (C, Ar), 128.0 (C, Ar), 129.6 (C, Ar), 134.2 (C, Ar), 137.3 (C, Ar), 137.5 (C, Ar), 141.9 (C, Ar), 149.7 (C, Ar), 153.4 (C=N), 168.3 (S-C=N). Anal. Calcd for $C_{15}H_{11}BrN_4S$: C, 50.15; H, 3.09; N, 15.60; S, 8.93; found: C, 50.11; H, 3.06; N, 15.65; S, 8.97. HRMS (ESI): 358.9608 [M+H]⁺.

4.4.4. 5-Methyl-2-(2-(pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (6)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 58%, m.p. (°C): 202. IR (KBr, cm^{-1}): 1554 (C=N), 1609 (C=N), 3152 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.43 (s, 3H, CH₃), 7.91 (s, 1H, CH), 7.41–7.60 (m, 4H, Ar), 8.03–8.58 (m, 4H, Ar), 13.05 (broad s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.3 (CH₃), 118.7 (S-CH), 119.6 (C, Ar), 120.3 (C, Ar), 123.8 (C, Ar), 129.8 (C, Ar), 131.3 (C, Ar), 134.1 (C, Ar), 138.0 (C, Ar), 139.6 (C, Ar), 148.4 (C=N), 167.0 (S-C=N). Anal. Calcd for $C_{16}H_{13}BrN_4S$: C, 51.48; H, 3.51; N, 15.01; S, 8.59; found: C, 51.53; H, 3.54; N, 15.04; S, 8.62. HRMS (ESI): 374.9846 [M+H]⁺.

4.4.5. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole (7)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 78%, m.p. (°C): 228. IR (KBr, cm^{-1}): 1552 (C=N), 1613 (C=N), 3029 (N-H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 4.92 (broad s, 1H, NH), 7.25 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar), 7.45 (s, 1H, CH of thiazole), 7.65 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, Ar), 7.90 (dd, *J* = 5.6, 8.8 Hz, 2H, Ar), 8.08 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.15 (s, 1H, CH), 8.21 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar), 8.70 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 105.4 (S-CH), 115.4 (C, Ar), 115.6 (C, Ar), 122.3 (C, Ar), 125.1 (C, Ar), 127.5 (C, Ar), 127.6 (C, Ar), 130.8 (C, Ar), 133.5 (C, Ar), 143.4 (C, Ar), 143.8 (C=N), 148.3 (C, Ar), 149.6 (C, Ar), 160.5 (C-F), 162.9 (C-F), 167.1 (S-C=N). Anal. Calcd for $C_{15}H_{11}FN_4S$: C, 60.39; H, 3.72; N, 18.78; S, 10.75; found: C, 60.37; H, 3.74; N, 18.81; S, 10.77. HRMS (ESI): 299.0741 [M+H]⁺.

4.4.6. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (8)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded orange crystals, Yield: 61%, m.p. (°C): 187. IR (KBr, cm^{-1}): 1587 (C=N), 1610 (C=N), 3069 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 3.79 (s, 3H, CH₃), 6.97 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 7.29 (s, 1H, CH of thiazole), 7.73 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, Ar), 7.78 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 8.14 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 8.17 (s, 1H, CH), 8.32 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 8.72 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar), 12.15 (broad s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 55.2 (CH₃), 103.3 (S-CH), 114.1 (C, Ar), 122.1 (C, Ar), 124.9 (C, Ar), 126.9 (C, Ar), 134.3 (C, Ar), 143.2 (C, Ar), 144.1 (C, Ar), 148.8 (C, Ar), 150.4 (C=N), 167.1 (S-C=N). Anal. Calcd for $C_{16}H_{14}N_4OS$: C, 61.92; H, 4.55; N, 18.05; S, 10.33; found: C, 61.90; H, 4.57; N, 18.08; S, 10.34. HRMS (ESI): 311.0928 [M+H]⁺.

4.4.7. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole (9)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 74%, m.p. (°C): 226. IR (KBr, cm^{-1}): 1552 (C=N), 1612 (C=N), 3030 (N-H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 7.48 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar), 7.75 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, Ar), 7.56 (s, 1H, CH of thiazole), 7.88 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 8.20 (s, 1H, CH), 8.33 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, Ar), 8.43 (broad s, 1H, NH), 8.75 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 105.1 (S-CH), 119.4 (C, Ar), 123.7 (C, Ar), 127.2 (C, Ar), 128.6 (C, Ar), 132.0 (C, Ar), 133.4 (C, Ar), 137.2 (C, Ar), 141.2 (C, Ar), 149.1 (C, Ar), 149.4 (C, Ar), 152.8 (C=N), 167.8 (S-C=N). Anal. Calcd for $C_{15}H_{11}ClN_4S$: C, 57.23; H, 3.52; N, 17.80; S, 10.19; found: C, 57.24; H, 3.51; N, 17.82; S, 10.18. HR-MS (ESI): 315.0441 [M+H]⁺.

4.4.8. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (10)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 68%, m.p. (°C): 211. IR (KBr, cm^{-1}): 1551 (C=N), 1615 (C=N), 3058 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 7.52–7.91 (m, 5H, Ar), 8.15–8.82 (m, 4H, Ar), 12.18 (s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 111.3 (S-CH), 121.9 (C, Ar), 125.3 (C, Ar), 126.3 (C, Ar), 128.1 (C, Ar), 130.2 (C, Ar), 132.1 (C, Ar), 132.7 (C, Ar), 135.8 (C, Ar), 142.6 (C, Ar), 144.2 (C, Ar), 146.5 (C, Ar), 149.8 (C=N), 166.9 (S-C=N). Anal. Calcd for $C_{15}H_{10}Cl_2N_4S$: C, 51.59; H, 2.89; N, 16.04; S, 9.18; found: C, 51.57; H, 2.86; N, 16.03; S, 9.15. HR-MS (ESI): 349.0144 [M+H]⁺.

4.4.9. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (11)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 59%, m.p. (°C): 217. IR (KBr, cm^{-1}): 1563 (C=N), 1614 (C=N), 3154 (N-H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 5.22 (broad s, 1H, NH), 7.54–7.88 (m, 5H, Ar), 8.15–8.71 (m, 4H, Ar). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 110.9 (S-CH), 121.6 (C, Ar), 124.9 (C, Ar), 127.5 (C, Ar), 129.7 (C, Ar), 131.7 (C-Cl), 132.2 (C, Ar), 132.7 (C-Cl), 134.6 (C, Ar), 142.7 (C, Ar), 143.9 (C, Ar), 146.0 (C, Ar), 149.0 (C=N), 166.4 (S-C=N). Anal. Calcd for $C_{15}H_{10}Cl_2N_4S$: C, 51.59; H, 2.89; N, 16.04; S, 9.18; found: C, 51.62; H, 2.85; N, 16.07; S, 9.20. HRMS (ESI): 349.0068 [M+H]⁺.

4.4.10. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(3-nitrophenyl)-1,3-thiazole (12)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded orange crystals, Yield: 31%, m.p. (°C): 226. IR (KBr, cm^{-1}): 1355 (NO₂), 1560 (C=N), 1596 (C=N), 3413 (N-H). 4.45 (broad s, 1H, NH), 7.67 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, Ar), 7.72 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 7.81 (s, 1H, CH of thiazole), 8.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.16 (s, 1H, CH), 8.26 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar), 8.31 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar), 8.67 (s, 1H, Ar), 8.72 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 108.1 (S-CH), 119.9 (C, Ar), 121.9 (C, Ar), 125.0 (C, Ar), 130.3 (C, Ar), 131.6 (C, Ar), 135.0 (C, Ar), 135.7 (C, Ar), 142.8 (C, Ar), 144.4 (C, Ar), 148.2 (C, Ar), 148.8 (C-NO₂), 167.4 (C=N). Anal. Calcd for $C_{15}H_{11}N_5O_2S$: C, 55.38; H, 3.41; N, 21.53; S, 9.86; found: C, 55.41; H, 3.39; N, 21.56; S, 9.88. HRMS (ESI): 326.0680 [M+H]⁺.

4.4.11. 2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(4-nitrophenyl)-1,3-thiazole (13)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded orange crystals, Yield: 42%, m.p. (°C): 220. IR (KBr, cm^{-1}): 1338 (NO₂), 1539 (C=N), 1598 (C=N), 3148 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 4.74 (broad s, 1H, NH), 7.21 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, Ar), 7.50 (s, 1H, CH of thiazole), 7.74 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar), 7.83 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar), 7.98 (s, 1H, CH), 8.07 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar), 8.22 (d, *J* = 9.1 Hz, 2H, Ar), 8.47 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm:

56

M.V.O. Cardoso et al. / European Journal of Medicinal Chemistry 86 (2014) 48–59

110.0 (S—CH), 121.6 (C, Ar), 124.1 (C, Ar), 124.8 (C, Ar), 125.7 (C, Ar), 126.4 (C, Ar), 135.9 (C, Ar), 140.2 (CH₂), 142.1 (C, Ar), 145.0 (C, Ar), 146.3 (C, Ar), 148.6 (C, Ar), 149.3 (C—NO₂), 167.6 (C=N) 168.9 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₅H₁₁N₅O₂S: C, 55.38; H, 3.41; N, 21.53; S, 9.86; found: C, 55.41; H, 3.46; N, 21.56; S, 9.88. HRMS (ESI): 326.0696 [M+H]⁺.

4.4.12. *(2-(2-(Pyridin-2-ylmethylene)hydrazinyl)-4-(naphthalen-1-yl)-1,3-thiazole (14)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded brown crystals, Yield: 87%, m.p. (°C): 216. IR (KBr, cm⁻¹): 1540 (C=N), 1602 (C=N), 3112 (N—H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 7.31 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, Ar), 7.45 (s, 1H, CH of thiazole), 7.49 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 7.82 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.94–7.85 (m, 5H, Ar), 8.00 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar), 8.07 (s, 1H, CH), 8.37 (broad s, 1H, NH), 8.54 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 106.5 (S—CH), 122.5 (C, Ar), 123.8 (C, Ar), 124.2 (C, Ar), 125.2 (C, Ar), 126.1 (C, Ar), 126.4 (C, Ar), 127.5 (C, Ar), 128.1 (C, Ar), 128.2 (C, Ar), 131.5 (C, Ar), 132.5 (C, Ar), 132.7 (C, Ar), 133.0 (C, Ar), 142.8 (CH₂), 144.4 (C, Ar), 147.7 (C, Ar), 150.5 (C=N), 167.0 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₉H₁₄N₄S: C, 69.07; H, 4.27; N, 16.96; S, 9.70; found: C, 69.09; H, 4.24; N, 16.94; S, 9.73. HRMS (ESI): 331.1007 [M+H]⁺.

4.4.13. *(2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-phenyl-1,3-thiazole (15)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 79%, m.p. (°C): 151. IR (KBr, cm⁻¹): 1575 (C=N), 1615 (C=N), 3058 (N—H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.43 (s, 3H, CH₃), 5.53 (broad s, 1H, NH), 7.30 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 7.39 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar), 7.44 (s, 1H, CH of thiazole), 7.76 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H, Ar), 7.85 (d, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar), 8.23 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar), 8.35 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.73 (d, *J* = 5.5 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 13.4 (CH₃), 105.9 (S—CH), 123.6 (C, Ar), 125.6 (C, Ar), 126.0 (C, Ar), 128.4 (C, Ar), 129.2 (C, Ar), 134.2 (C, Ar), 141.0 (C, Ar), 143.9 (C, Ar), 144.6 (C, Ar), 147.5 (C, Ar), 150.0 (C=N), 168.9 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₄N₄S: C, 65.28; H, 4.79; N, 19.03; S, 10.89; found: C, 65.31; H, 4.82; N, 19.06; S, 10.87. HRMS (ESI): 295.0985 [M+H]⁺.

4.4.14. *(2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-tolyl)-1,3-thiazole (16)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 68%, m.p. (°C): 143. IR (KBr, cm⁻¹): 1496 (C=N), 1613 (C=N), 3058 (N—H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.31 (s, 3H, CH₃), 2.39 (s, 3H, CH₃), 3.84 (broad s, 1H, NH), 7.21 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar), 7.28 (s, 1H, CH of thiazole), 7.35 (t, *J* = 6.1 Hz, 1H, Ar), 7.76 (d, *J* = 8.1 Hz, 2H, Ar), 7.83 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 8.57 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.7 (CH₃), 20.7 (CH₃), 103.9 (S—CH), 121.7 (C, Ar), 124.4 (C, Ar), 125.8 (C, Ar), 129.1 (C, Ar), 136.9 (C, Ar), 141.0 (C, Ar), 143.6 (C, Ar), 145.3 (C, Ar), 148.3 (Ar), 151.7 (C=N), 168.9 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₇H₁₆N₄S: C, 66.21; H, 5.23; N, 18.17; S, 10.40; found: C, 66.26; H, 5.26; N, 18.18; S, 10.39. HR-MS (ESI): 309.7527 [M+H]⁺.

4.4.15. *(2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (17)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 61%, m.p. (°C): 202. IR (KBr, cm⁻¹): 1567 (C=N), 1615 (C=N), 3029 (N—H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.39 (s, 3H, CH₃), 7.36 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H, Ar), 7.45 (s, 1H, CH of thiazole), 7.60 (d, *J* = 8.6 Hz, 2H, Ar), 7.87–7.81 (m, 4H, Ar), 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 8.57 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar), 10.33 (broad s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.7 (CH₃), 105.8 (S—CH), 120.0 (C, Ar), 121.0 (C, Ar), 123.9 (C, Ar), 127.4 (C, Ar), 128.0 (C, Ar), 132.0 (C, Ar), 134.4 (C, Ar), 137.1 (C, Ar), 147.6 (C, Ar), 149.0 (C, Ar), 155.3 (C=N),

170.0 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₃BrN₄S: C, 51.48; H, 3.51; N, 15.01; S, 8.59; found: C, 51.51; H, 3.54; N, 15.04; S, 8.56. HRMS (ESI): 373.8177 [M+H]⁺.

4.4.16. *5-Methyl-(2-(1-(pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-bromophenyl)-1,3-thiazole (18)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 52%, m.p. (°C): 198. IR (KBr, cm⁻¹): 1565 (C=N), 1604 (C=N), 3164 (N—H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.33 (s, 3H, CH₃), 2.40 (s, 3H, CH₃), 7.28 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, Ar), 7.60–7.57 (m, 4H, Ar), 7.77 (t, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar), 7.99 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.52 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, Ar), 8.81 (broad s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.6 (CH₃), 12.7 (CH₃), 119.0 (S—CH), 119.9 (C, Ar), 120.6 (C, Ar), 123.7 (C, Ar), 130.3 (C, Ar), 131.7 (C, Ar), 134.8 (C, Ar), 136.9 (C, Ar), 155.4 (C, Ar), 149.0 (C=N), 166.0 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₇H₁₅BrN₄S: C, 52.72; H, 3.90; N, 14.47; S, 8.28; found: C, 52.75; H, 3.94; N, 14.45; S, 8.26. HRMS (ESI): 387.8449 [M+H]⁺.

4.4.17. *(2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-fluorophenyl)-1,3-thiazole (19)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 73%, m.p. (°C): 209. IR (KBr, cm⁻¹): 1560 (C=N), 3060 (N—H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.42 (s, 3H, CH₃), 6.07 (broad s, 1H, NH), 7.25 (d, *J* = 8.6, 5.6 Hz, 2H, Ar), 7.40 (s, 1H, CH of thiazole), 7.57 (t, *J* = 5.0 Hz, 1H, Ar), 7.91 (dd, *J* = 8.6, 5.6 Hz, 2H, Ar), 8.12 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.13 (t, *J* = 7.2 Hz, 1H, Ar), 8.65 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.4 (CH₃), 104.4 (S—CH), 115.4 (C, Ar), 120.2 (C, Ar), 123.7 (C, Ar), 127.5 (C, Ar), 131.2 (C, Ar), 137.8 (C, Ar), 146.0 (C, Ar), 147.7 (C, Ar), 154.0 (C, Ar), 160.0 (C=N), 169.3 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₃FN₄S: C, 61.52; H, 4.19; N, 17.94; S, 10.27; found: C, 61.57; H, 4.21; N, 17.95; S, 10.30. HRMS (ESI): [M+H]⁺.

4.4.18. *(2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-methoxyphenyl)-1,3-thiazole (20)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded orange crystals, Yield: 58%, m.p. (°C): 216. IR (KBr, cm⁻¹): 1496 (C=C), 1610 (C=N), 3359 (N—H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.42 (s, 3H, CH₃), 3.78 (s, 3H, CH₃), 7.25 (s, 1H, S—CH), 6.98–7.93 (m, 4H, Ar), 8.19–8.83 (m, 4H, Ar), 10.90 (broad s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.7 (CH₃), 55.1 (CH₃), 102.7 (S—CH), 114.0 (C, Ar), 121.7 (C, Ar), 124.4 (C, Ar), 124.5 (C, Ar), 125.9 (C, Ar), 126.9 (C, Ar), 143.6 (C, Ar), 145.4 (C, Ar), 158.9 (C=N), 169.5 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₇H₁₆N₄OS: C, 62.94; H, 4.97; N, 17.27; S, 9.88; found: C, 62.91; H, 4.95; N, 17.28; S, 9.90. HR-MS (ESI): 325.0975 [M+H]⁺.

4.4.19. *(2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-chlorophenyl)-1,3-thiazole (21)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 73%, m.p. (°C): 222. IR (KBr, cm⁻¹): 1574 (C=N), 1603 (C=N), 3359 (N—H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.39 (s, 3H, CH₃), 7.35 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, Ar), 7.42 (s, 1H, CH of thiazole), 7.46 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 7.83 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar), 7.89 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar), 8.02 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar), 8.56 (d, *J* = 4.2 Hz, 1H, Ar), 11.45 (broad s, 1H, NH). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 13.4 (CH₃), 106.5 (S—CH), 122.6 (C, Ar), 125.3 (C, Ar), 127.7 (C, Ar), 129.2 (C, Ar), 132.6 (C, Ar), 133.6 (C, Ar), 143.0 (C, Ar), 145.5 (C, Ar), 151.7 (C=N), 169.4 (S—C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₃ClN₄S: C, 58.44; H, 3.98; N, 17.04; S, 9.75; found: C, 58.47; H, 3.95; N, 17.09; S, 9.71. HR-MS (ESI): 329.8148 [M+H]⁺.

4.4.20. *(2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(2,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (22)*

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 62%, m.p. (°C): 227; IR (KBr, cm⁻¹): 1521 (C=N), 1609

(C=N), 3058 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.04 (broad s, 1H, NH), 7.43 (s, 1H, CH of thiazole), 7.32–7.88 (m, 3H, Ar), 8.19–8.69 (m, 4H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.8 (CH₃), 105.0 (S-CH), 124.4 (C, Ar), 125.5 (C, Ar), 127.7 (C, Ar), 128.6 (C, Ar), 134.2 (C, Ar), 141.2 (C, Ar), 143.1 (C, Ar), 145.4 (C, Ar), 151.7 (C=N), 169.0 (S-C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₂Cl₂N₄S: C, 52.90; H, 3.33; N, 15.42; S, 8.83; found: C, 52.93; H, 3.35; N, 15.47; S, 8.84. HR-MS (ESI): 362.9432 [M+H]⁺.

4.4.21. (2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,3-thiazole (**23**)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded yellow crystals, Yield: 69%, m.p. (°C): 209. IR (KBr, cm⁻¹): 1554 (C=N), 1614 (C=N), 3061 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.12 (broad s, 1H, NH), 7.48 (s, 1H, CH of thiazole), 7.29–7.83 (m, 3H, Ar), 8.12–8.63 (m, 4H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.8 (CH₃), 110.4 (S-CH), 121.3 (C, Ar), 124.3 (C, Ar), 127.4 (C, Ar), 128.6 (C, Ar), 145.4 (C, Ar), 145.8 (C, Ar), 146.3 (C, Ar), 152.2 (C, Ar), 158.1 (C=N), 169.4 (S-C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₂Cl₂N₄S: C, 52.90; H, 3.33; N, 15.42; S, 8.83; found: C, 52.89; H, 3.31; N, 15.43; S, 8.80. HR-MS (ESI): 363.0220 [M+H]⁺.

4.4.22. (2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(3-nitrophenyl)-1,3-thiazole (**24**)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded orange crystals, Yield: 49%, m.p. (°C): 229. IR (KBr, cm⁻¹): 1345 (NO₂), 1453 (C=C), 1601 (C=N), 3054 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.43 (s, 3H, CH₃), 4.11 (bs, 1H, NH), 7.47 (s, 1H, S-CH), 7.38–7.91 (m, 4H, Ar), 8.15–8.71 (m, 4H, Ar). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.8 (CH₃), 107.8 (C, Ar), 119.9 (C, Ar), 121.7 (C, Ar), 122.1 (C, Ar), 124.5 (C, Ar), 130.2 (C, Ar), 131.5 (C, Ar), 135.9 (C, Ar), 138.6 (C, Ar), 141.1 (C, Ar), 145.5 (C, Ar), 147.5 (C=N), 148.2 (C-NO₂), 169.0 (S-C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₃N₅O₂S: C, 56.63; H, 3.86; N, 20.64; S, 9.45; found: C, 56.65; H, 3.89; N, 20.67; S, 9.48. HR-MS (ESI): 340.0851 [M+H]⁺.

4.4.23. (2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(4-nitrophenyl)-1,3-thiazole (**25**)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded orange crystals, Yield: 58%, m.p. (°C): 245. IR (KBr, cm⁻¹): 1577 (C=N), 1596 (C=N), 3342 (N-H). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 2.37 (s, 3H, CH₃), 7.30 (t, *J* = 6.2 Hz, 1H, Ar), 7.63 (s, 1H, CH of thiazole), 7.74 (broad s, 1H, NH), 7.79 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar), 8.02 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar), 8.10 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar), 8.25 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar), 8.53 (d, *J* = 4.8 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 12.4 (CH₃), 108.6 (S-CH), 119.4 (C, Ar), 122.9 (C, Ar), 124.2 (C, Ar), 126.3 (C, Ar), 136.4 (C, Ar), 141.2 (C, Ar), 146.1 (C, Ar), 148.6 (C, Ar), 155.5 (C=N), 172.0 (S-C=N). Anal. Calcd for C₁₆H₁₃N₅O₂S: C, 56.63; H, 3.86; N, 20.64; S, 9.45; found: C, 56.67; H, 3.87; N, 20.65; S, 9.48. HR-MS (ESI): 340.0683 [M+H]⁺.

4.4.24. (2-(1-(Pyridin-2-yl)ethylene)hydrazinyl)-4-(naphthalen-1-yl)-1,3-thiazole (**26**)

Crystallization from toluene/hexane 7:3, afforded brown crystals, Yield: 89%, m.p. (°C): 203. IR (KBr, cm⁻¹): 1556 (C=N), 1614 (C=N), 3035 (N-H). ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 1.70 (s, 3H, CH₃), 3.66 (broad s, 1H, NH), 7.48 (s, 1H, CH of thiazole), 7.30–7.52 (m, 4H, Ar), 7.81–8.00 (m, 6H, Ar), 8.55 (d, *J* = 4.9 Hz, 1H, Ar). ¹³C NMR (75.5 MHz, DMSO-*d*₆), δ ppm: 24.0 (CH₃), 104.5 (S-CH), 119.0 (C, Ar), 124.0 (C, Ar), 124.1 (C, Ar), 126.4 (C, Ar), 127.6 (C, Ar), 128.0 (C, Ar), 128.1 (C, Ar), 136.7 (C, Ar), 144.3 (C, Ar), 149.4 (C, Ar), 150.3 (C, Ar), 153.7 (C=N), 169.3 (S-C=N). Anal. Calcd for C₂₀H₁₆N₄S: C, 69.74; H, 4.68; N, 16.27; S, 9.31; found: C, 69.70; H, 4.70; N, 16.31; S, 9.34. HR-MS (ESI): 345.1143 [M+H]⁺.

4.5. Cruzain inhibition

Recombinant cruzain was gently provided by Alison Doak and Dr. Brian Shoichet, from the University of California San Francisco. Cruzain activity was measured as previously described [26], by monitoring the cleavage of the fluorogenic substrate Z-Phe-Arg-aminomethylcoumarin (Z-FR-AMC) in a Synergy 2 fluorimeter (Biotek), from the Center of Flow Cytometry and Fluorimetry at the Biochemistry and Immunology Department (UFMG), using filters of 340 nm for excitation and 440 nm for emission. All assays were performed in sodium acetate 0.1 M pH 5.5 and in the presence of 5 mM dithiothreitol (DTT) and 0.01% Triton X-100, in a final volume of 200 μL and on a 96 well plate format. The final concentration of cruzain was 0.5 nM, and the substrate concentration was 2.5 μM (K_m = 1 μM). In all assays, enzyme inhibition was measured after a 10-min pre-incubation of the compounds with enzyme. Compounds were initially screened at 100 μM, unless they were insoluble at this concentration, in which cases they were tested at 75 μM or 50 μM. If cruzain inhibition higher than 70% was observed at the original screening, IC₅₀ was determined based on at least seven inhibitor concentrations, always after pre-incubation with cruzain for 10 min. All assays were performed in at least two independent experiments, each one in triplicates, and were followed for 5 min. Activity was calculated based on comparison to a DMSO control. Data was analysed with Prism 5.0 (GraphPad).

4.6. Parasites

Epimastigotes of *T. cruzi* (Y strain) were maintained at 26 °C in LIT medium (Liver Infusion Tryptose) supplemented with 10% foetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 1% hemin (Sigma Co, St. Louis, MO, USA), 1% R9 medium (Sigma Co), and 50 μg/mL gentamycin (Novafarma, Anápolis, GO, Brazil). Bloodstream trypomastigotes forms of *T. cruzi* were obtained from supernatants of LLC-MK₂ cells previously infected and maintained in RPMI-1640 medium (Sigma Co) supplemented with 10% FBS, and 50 μg/mL gentamycin at 37 °C and 5% CO₂.

4.7. Cytotoxicity for HepG2

The HepG2 cytotoxicity assay was adapted from Ballell et al. [27]. Actively growing HepG2 cells were removed from a T-175 TC flask using supplemented Eagle's MEM and plated at a density of 3000 cells/well into the 384-well clear-bottom plates using a Multidrop instrument. Prior to addition of the cell suspension, the screening compounds (250 nL) were dispensed into the plates with an Echo 555 instrument. Plates were allowed to incubate at 37 °C at 80% relative humidity for 48 h under 5% CO₂. The signal developer, CellTiter-Glo (Promega) was added to the plates using a Multidrop and the plates were read using a ViewLux instrument (PerkinElmer).

4.8. Antiproliferative activity for epimastigotes

Epimastigotes were counted in a hemocytometer and then dispensed into 96-well plates at a cell density of 10⁵ cells/well. Test inhibitors, dissolved in DMSO, were diluted into five different concentrations (1.23, 3.70, 11.11, 33.33, and 100 μg/mL) and added to the respective wells in triplicate. The plate was incubated for 11 days at 26 °C, and aliquots of each well were collected and the number of viable parasites were counted in a Neubauer chamber, and compared to untreated parasite culture. IC₅₀ values were calculated using non-linear regression on Prism 4.0 GraphPad software. This experiment was done in duplicate, and Benznidazole (LAFEPE, Brazil) were used as the reference inhibitors.

58

M.V.O. Cardoso et al. / European Journal of Medicinal Chemistry 86 (2014) 48–59

4.9. Toxicity for *Y* strain trypomastigotes

Trypomastigotes collected from the supernatant of LLC-MK₂ cells were dispensed into 96-well plates at a cell density of 4×10^5 cells/well. Test inhibitors, dissolved in DMSO, were diluted into five different concentrations and added into their respective wells, and the plate was incubated for 24 h at 37 °C and 5% of CO₂. Aliquots of each well were collected and the number of viable parasites, based on parasite motility, was assessed in a Neubauer chamber. The percentage of inhibition was calculated in relation to untreated cultures. IC₅₀ calculation was also carried out using non-linear regression with Prism 4.0 GraphPad software. Benznidazole was used as the reference drug.

4.10. Docking studies

The structures of all compounds were obtained by application of the RM1 [34] method, available as part of the SPARTAN 08' program [35], using internal default settings for convergence criteria. Docking calculations and analysis was carried using the *T. cruzi* cruzain (PDB ID code: 3IUT) as the target [30], in which there was a cocrystallized complex with an inhibitor (referred to as "KB2"). The active site was defined as all atoms within a radius of 6.0 Å from this cocrystallized ligand. The residues GLN19, CYS25, SER61, LEU67, MET68, ASN70, ASP161, HIS162, TRP184 and GLU208 were treated as flexible. The GOLD 5.1 program [36] was used for docking calculations, followed by Binana program [37], which was used to analyse the molecular interactions present in the best docking solutions, using default setting, except for hydrogen bond distance (changed to a maximum of 3.5 Å). Figures were generated with Pymol [38].

Acknowledgements

We would like to thank the Brazilian National Research Council (CNPq), Research Foundation of Pernambuco State (FACEPE) and FIOCRUZ for financial support. M.V.O.C. holds a FACEPE scholarship, while D.R.M.M. holds a FAPESB scholarship. We also thank the Department of Fundamental Chemistry-UFPE for recording the ¹H NMR, ¹³C NMR, LCMS and IR spectra of all compounds. M.V.O.C. is thankful to P.V.B. in accept a doctoral internship at the University of Queensland. R.S.F. is thankful to Dr. Anna Tochowicz (University of California, San Francisco (UCSF), USA) for providing recombinant cruzain. We also thank members of the Kineto DPU at GlaxoSmithKline Spain for their support in cytotoxicity studies and comments on the manuscript. All authors declare no competing financial interest.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.012>.

References

- [1] WHO/Chagas disease (American trypanosomiasis).
- [2] F. Guhl, J.A. Urbina, Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches, *Acta Trop.* 115 (2010) 55–68.
- [3] V.G. Duschak, A.S. Couto, An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease, *Recent Pat. Antiinfect. Drug Discov.* 2 (2007) 19–51.
- [4] J.H. McKerrow, P.J. Rosenthal, R. Swenerton, P. Doyle, Development of protease inhibitors for protozoan infections, *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21 (2008) 668–672.
- [5] J.A. Urbina, R. Docampo, Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances, *Trends Parasitol.* 19 (2003) 495–501.
- [6] J. Urbina, Chemotherapy of Chagas disease, *Curr. Pharm. Des.* 8 (2002) 287–295.
- [7] P. Veiga-Santos, E.S. Barrias, J.F.C. Santos, T.L. de Barros Moreira, T.M.U. de Carvalho, J.A. Urbina, et al., Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*, *Int. J. Antimicrob. Agents* 40 (2012) 61–71.
- [8] J.A. Pérez-Molina, J. Sejo-Dorado, F. Norman, B. Monge-Maillo, M. Díaz-Méndez, P. Albajar-Vinas, et al., Nifurtimox therapy for Chagas disease does not cause hypersensitivity reactions in patients with such previous adverse reactions during benznidazole treatment, *Acta Trop.* 127 (2013) 101–104.
- [9] J. McKerrow, Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections, *Bioorg. Med. Chem.* 7 (1999) 639–644.
- [10] A.E. Eakin, M.E. McGrath, J.H. McKerrow, R.J. Fletcher, C.S. Craik, Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 6115–6118.
- [11] J.H. McKerrow, M.E. McGrath, J.C. Engel, The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design, *Parasitol. Today* 11 (1995) 279–282.
- [12] M.E. McGrath, A.E. Eakin, J.C. Engel, J.H. McKerrow, C.S. Craik, R.J. Fletcher, The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease, *J. Mol. Biol.* 247 (1995) 251–259.
- [13] G. Harth, N. Andrews, A.A. Mills, J.C. Engel, R. Smith, J.H. McKerrow, Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*, *Mol. Biochem. Parasitol.* 58 (1993) 17–24.
- [14] S.S. Gawande, S.C. Warangkar, B.P. Bandgar, C.N. Khobragade, Synthesis of new heterocyclic hybrids based on pyrazole and thiazolidinone scaffolds as potent inhibitors of tyrosinase, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 2772–2777.
- [15] G.N. Masoud, A.M. Youssef, M.M. Abdel Khalek, A.E. Abdel Wahab, I.M. Labouta, A.A.B. Hazzaa, Design, synthesis, and biological evaluation of new 4-thiazolidinone derivatives substituted with benzimidazole ring as potential chemotherapeutic agents, *Med. Chem. Res.* 22 (2012) 707–725.
- [16] D.R.M. Moreira, S.P.M. Costa, M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, G.B. de Oliveira Filho, C.M.L. de Melo, et al., Structural investigation of anti-*Trypanosoma cruzi* 2-iminothiazolidin-4-ones allows the identification of agents with efficacy in infected mice, *J. Med. Chem.* 55 (2012) 10918–10936.
- [17] C. Pizzo, C. Saiz, A. Talevi, L. Gavernet, P. Palestro, C. Bellera, et al., Synthesis of 2-hydrazolyl-4-thiazolidinones based on multicomponent reactions and biological evaluation against *Trypanosoma Cruzi*, *Chem. Biol. Drug Des.* 77 (2011) 166–172.
- [18] D.C. Greenbaum, Z. Mackey, E. Hansell, P. Doyle, J. Gut, C.R. Caffrey, et al., Synthesis and structure-activity relationships of parasiticidal thiosemicarbazone cysteine protease inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, and *Trypanosoma cruzi*, *J. Med. Chem.* 47 (2004) 3212–3219.
- [19] M.E. Caputto, A. Ciccarelli, F. Frank, A.G. Moglioni, G.Y. Moltrasio, D. Vega, et al., Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolylhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents, *Eur. J. Med. Chem.* 55 (2012) 155–163.
- [20] M.Z. Hernandez, M.M. Rabello, A.C.L. Leite, M.V.O. Cardoso, D.R.M. Moreira, D.J. Brondani, et al., Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (2010) 7826–7835.
- [21] A.C.L. Leite, R.S. de Lima, D.R.M. Moreira, M.V.D.O. Cardoso, A.C. Gouveia de Brito, L.M. Farias Dos Santos, et al., Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 3749–3757.
- [22] A.C.L. Leite, D.R. de M. Moreira, M.V. de O. Cardoso, M.Z. Hernandez, V.R. Alves Pereira, R.O. Silva, et al., Synthesis, cruzain docking, and in vitro studies of aryl-4-oxothiazolylhydrazones against *Trypanosoma cruzi*, *ChemMedChem* 2 (2007) 1339–1345.
- [23] D.-N. Zhang, J.-T. Li, Y.-L. Song, H.-M. Liu, H.-Y. Li, Efficient one-pot three-component synthesis of N-(4-arylthiazol-2-yl) hydrazones in water under ultrasound irradiation, *Ultrason. Sonochem.* 19 (2012) 475–478.
- [24] F. Chimentì, B. Bizzarri, E. Maccioni, D. Secci, A. Bolasco, P. Chimentì, et al., A novel histone acetyltransferase inhibitor modulating Gcn5 network: cyclopentylidene-[4-(4'-chlorophenyl)thiazol-2-yl]hydrazone, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 530–536.
- [25] D.R. Richardson, D.S. Kalinowski, V. Richardson, P.C. Sharpe, D.B. Lovejoy, M. Islam, et al., 2-Acetylpyridine thiosemicarbazones are potent iron chelators and antiproliferative agents: redox activity, iron complexation and characterization of their antitumor activity, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 1459–1470.
- [26] R.S. Ferreira, C. Bryant, K.K.H. Ang, J.H. McKerrow, B.K. Shoichet, A.R. Renslo, Divergent modes of enzyme inhibition in a homologous structure-activity series, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5005–5008.
- [27] L. Ballell, R.H. Bates, R.J. Young, D. Alvarez-Gomez, E. Alvarez-Ruiz, V. Barroso, et al., Fueling open-source drug discovery: 177 small-molecule leads against tuberculosis, *ChemMedChem* 8 (2013) 313–321.
- [28] V. Mersch-Sundermann, S. Knasmüller, X.-J. Wu, F. Darroudi, F. Kassie, Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, anti-genotoxic and cogenotoxic agents, *Toxicology* 198 (2004) 329–340.
- [29] O. Korb, T. Stützel, T.E. Exner, Empirical scoring functions for advanced protein-ligand docking with PLANTS, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 84–96.

- [30] K. Brak, I.D. Kerr, K.T. Barrett, N. Fuchi, M. Debnath, K. Ang, et al., Nonpeptidic tetrafluorophenoxymethyl ketone cruzain inhibitors as promising new leads for Chagas disease chemotherapy, *J. Med. Chem.* 53 (2010) 1763–1773.
- [31] G.M. Sheldrick, A short history of SHELX, *Acta Crystallogr. A* 64 (2008) 112–122.
- [32] L.J. Farrugia, ORTEP -3 for windows – a version of ORTEP-III with a graphical user interface (GUI), *J. Appl. Crystallogr.* 30 (1997) 565–565.
- [33] L.J. Farrugia, WinGX suite for small-molecule single-crystal crystallography, *J. Appl. Crystallogr.* 32 (1999) 837–838.
- [34] G.B. Rocha, R.O. Freire, A.M. Simas, J.J.P. Stewart, RM1: a reparameterization of AM1 for H, C, N, O, P, S, F, Cl, Br, and I, *J. Comput. Chem.* 27 (2006) 1101–1111.
- [35] Spartan '08 Tutorial and User's Guide: Wavefunction, 2008.
- [36] Gold software.
- [37] J.D. Durrant, J.A. McCammon, BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization, *J. Mol. Graph. Model.* 29 (2011) 888–893.
- [38] The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3, Schrödinger, LLC, 2002.

ANEXOS
ANEXO A

GlaxoSmithKline
Investigación y Desarrollo, S. L.
C/ Santiago Grisolia, 4 - PTM
28760 TRES CANTOS (Madrid)
Tel. 918 074 000
Fax: 918 074 062
www.gsk.com

Tres Cantos, 3rd June 2013

To whom it may correspond:

The Kinetoplastid Unit from the R&D department of GSK Spain is dedicated to the discovery of new drugs for the treatment of Neglected Tropical Diseases, due to parasites of *Trypanosoma* and *Leishmania* types. These diseases are sleeping sickness, Chagas disease and visceral leishmaniasis. The experimental approximation chosen for the identification of new active molecules against these microorganisms starts with a pharmacological screening of the GSK compounds collection. The biological assay to be used for the selection of active compounds consists in the *in vitro* culture of the parasites in multi-wells plates and detection and quantification of viable cells in the presence of each chemical compound to be tested. In the research program of this unit is envisaged a screening campaign for each pathogenic specie *T. brucei*, *T. cruzi* and *L. donovani*. The objective is to assay 1million compounds against each one of these microorganism using HTS methodologies ("high throughput screening").

Livia Bandeira Costa showed in her *curriculum vitae* an academic background and technical skills suitable to her incorporation to the research group in charge of the above mentioned HTS campaigns. I have personally supervised Livia Costa during her stay in our facilities. The activity plan designed for her encompassed the following tasks:

- *In vitro* culture of parasites
- Culture of host cell lines
- Run miniaturized growth assays of the different parasites in microplates
- Data analysis
- Elaboration of reports

These tasks have eventually focused on the screening campaigns against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*.

As a result of her fellowship, it was expected that Livia Costa would have been trained in parasitological techniques under biosafety conditions and high throughput screening techniques. Likewise, she would also have been exposed to the knowledge of other technologies and experimental procedures commonly used in a drug discovery setting. Alongside this initial plan, we envisaged the evaluation of some compounds from her home department at University of Pernambuco against a panel of biological assays in order to assess their anti-leishmanicidal and -trypanocidal potential.





Livia Costa joined GSK Tres Cantos on 10th September 2012. Although the initial plan was to stay for 12 months, she had to suddenly interrupt and terminate her project due to medical reasons non-related with work activities. Along all this process of illness while she was in Spain, Livia received my personal assistance as well as support from different individuals and Departments of GSK in order to help her to overcome this hard time. Unfortunately she had to return to Brazil on 13th March 2013.

Despite the sudden interruption of the program, Livia has successfully accomplished the tasks and goals set at the beginning for her fellowship. She has been able to integrate an interdisciplinary team comprised of quite a few individuals. Livia has been able to overcome language and cultural differences. She is an easy-going person, good listener and quick learner. We believe this is in accordance with her interests as declared in her work plan, and will be of benefit for her scientific career. **I personally approve her fellowship program.** In my humble opinion, Livia's stay in GSK has produced mutual benefit.

Some specific, training, tasks and achievements which have been successfully undertaken by Livia:

- Training on standard operating procedures for the work under biosafety level 3 (BSL3) regulations.
- Maintenance of cell cultures of THP-1 cells.
- Maintenance of cultures of *Leishmania donovani* amastigotes.
- Maintenance, logistics and operations of the BSL3 lab.
- Execution of high-throughput screening assays against axenic *Leishmania* and intracellular *T. cruzi*.
- Training on high-content screening in confocal fluorescence microscopy.
- Training on *in vitro* cytotoxicity assays.

The premature interruption of the program has precluded Livia from carrying out real experiments to evaluate compounds in intracellular *Leishmania* and *in vitro* cytotoxicity. Nevertheless she has acquired training in these assays by scientist shadowing. We had envisaged he would test a series of compounds from her home institution (University of Pernambuco). Instead, the compounds have been tested by GSK scientists. Therefore, the missing activities have barely impacted the achievement of objectives planned for the whole program.

Yours sincerely

Julio Martin-Plaza, PhD
Director of Screening and Compound Profiling, GSK R&D



ANEXO B**Challenge Exploration in Kinetoplastids Diseases: Assembling Three Anti-Leishmanial and Trypanosomal Boxes by High Throughput Screening of GSK Collection**

Julio Martin^a, Emilio Alvarez^a, Livia Bandeira^b, Ana I Bardera^a, Vanessa Barroso^a, Manuela Berlanga^a, Juan Cantizani^b, Gonzalo Colmenarejo^a, Ignacio Cotillo^b, Rosario Diaz^c, Francisco de Dios^a, Albane Kessler^b, Pilar Manzano^b, Julio A Padilla^d, Jesus Presa^a and Imanol Pena^a

^a *Molecular Discovery Research (MDR), Tres Cantos, Spain*

^b *Kinetoplastids DPU, DDW, Tres Cantos, Spain*

^c *CSIC (Centro Superior de Investigaciones Científicas), Spain*

^d *NYU (New York University), USA*

Neglected Tropical Diseases (NTDs) continue to cause significant morbidity and mortality in the developing world. Amongst these, Chagas Disease, Sleeping Sickness and Leishmaniasis are caused by infectious parasites called kinetoplastids (i.e. *Trypanosoma spp.* and *Leishmania spp.*). These parasites are infecting over 25 million people worldwide and causing more than 120,000 deaths annually. Despite the heavy medical, economic and social burden on entire populations in the developing world, very little effort, Pharma R&D investment and progress has been made in the past decades in the discovery of new treatments to combat these diseases. Current therapies lack of efficacy and show unacceptable levels of toxicity. Therefore, new therapies for kinetoplastids diseases are an urgent unmet need. Likewise, there are significant gaps of knowledge and lack of tools for drug discovery on these kinetoplastids diseases, stemming from the biological complexity of these bugs. The parasites exhibit multiple stages in the life-cycle in order to survive and be transmitted (e.g. insect vector, livestock and human), they can switch from extracellular to intracellular forms depending on their transmissibility or infectivity, they can live in bloodstream or tissues, they can actively replicate or be dormant, one single bug can cause acute infections or chronic diseases. Hence, the selection of the most relevant assays, markers or models for translational biology from *in vitro* to animals to clinic constitute a grand scientific challenge in drug discovery of these diseases.

DDW Kineto DPU and PTS Tres Cantos are aimed at screening the full 1.8 million GSK screening collection against each of the three most prominent kinetoplastid parasites, namely *L. donovani* (Leishmaniasis), *T. cruzi* (Chagas Disease) and *T. brucei* (Sleeping Sickness). We have been able to encompass the current HTS standards of quality and throughput with the biological relevance of phenotypic assays. In this poster, we will present how we have addressed scientific challenges, such as the detection of intracellular parasites and the scale-up of differentiated host cells and parasites. Likewise, the status and output of the three campaigns will be updated.