

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

MAYARA SOUZA BARBALHO

**INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA DE DERIVADOS 1,3 TIAZÓIS
SUBSTITUÍDOS**

RECIFE
2022

MAYARA SOUZA BARBALHO

Investigação da atividade tripanocida de derivados 1,3 tiazóis substituídos

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

Orientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandes

Coorientadora: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura

Dra. Ana Cristina Lima Leite

RECIFE

2022

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Barbalho, Mayara Souza.

Investigação da atividade tripanocida de derivados 1,3 tiazóis substituídos / Mayara Souza Barbalho. - Recife, 2022.

91f.: il.

Tese (Doutorado)- Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, 2022.

Orientação: Dra. Valéria Pereira Hernandes.

Coorientação: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura.

Coorientação: Dra. Ana Cristina Lima Leite.

1. Tripanossomíase americana; 2. Tiazóis; 3. In silico. I. Hernandes, Valéria Pereira. II. Moura, Danielle Maria Nascimento. III. Leite, Ana Cristina Lima. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MAYARA SOUZA BARBALHO

Investigação da atividade tripanocida de derivados 1,3 tiazóis substituídos

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

Aprovada em: 03/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Dr^a Valéria Pereira Hernandez

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

Dr^a Elis Dionísio da Silva

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

Dr. Policarpo Ademar Sales Junior

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

Dr^a Maria Edileuza Felinto de Brito

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

Dr. Maria Danielly Lima de Oliveira

Depto. de Bioquímica - Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho ao autor e consumidor da minha fé, Deus, pois sem Ele eu nada poderia fazer.

Agradeço também aos meus pais, Iara e Ivamário, que nunca mediram esforços para me apoiar em todas as etapas.

Ao meu marido, Raphael, por todo incentivo e por acreditar mais em mim do que eu mesma.

Ao meu filho Bernardo, espero que tenha muito orgulho da sua mãe.

Aos meus amigos e familiares, pois somos seres que precisamos uns dos outros e o apoio de vocês foi fundamental.

A minha orientadora Valéria por toda paciência e dedicação durante todos esses anos. Aprendi muito com sua força, ousadia e coragem.

As minhas co-orientadoras Ana Cristina e Maria Daniele, obrigada por todo conhecimento compartilhado.

A Maria Carolina meu muito obrigado, você me inspira em todas as suas atitudes, devo parte desse título a você.

Aos meus amigos de laboratório, vocês me acolheram, me ensinaram, foram minha família em Recife.

Aos funcionários e colaboradores do Instituto Aggeu Magalhães e UFPE, vocês são essenciais para continuidade da pesquisa. Paulo secretário do PPGIT, você é insubstituível, obrigado por tudo.

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

A Facepe pelo investimento.

“Sabemos que todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.”

Romanos 8:28

RESUMO

Barbalho, M. S. **Investigação da atividade tripanocida de derivados 1,3 tiazóis substituídos**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil, 2022.

O Brasil lidera o número de casos na América Latina ao se tratar de doença de Chagas, estimando-se 2 milhões de pessoas acometidas pela doença em nosso país. O tratamento da doença ainda é baseado no benznidazol, porém essa droga é mais efetiva na fase aguda e possui alta toxicidade. Diante disso, uma nova série de 1,3-tiazóis (2-17), derivados de 2,4-diclorofenil tiossemicarbazona ou 2,3,4-triclorofenil-tiossemicarbazona, foram investigados em ensaios *in vitro* e *in silico* sobre as formas evolutivas do *T. cruzi*. Contra a forma tripomastigota, alguns derivados de 1,3-tiazol apresentaram valores de IC₅₀ que foram pelo menos 10 vezes mais potentes que o benznidazol, como os compostos 8 (2,64 μ M), 4 (3,27 μ M), 10 (4,08 μ M) e 16 (4,82 μ M). Contra a forma amastigota, o composto 15 apresentou o melhor valor de IC₅₀ (3,65 μ M) sendo mais ativo que o fármaco padrão, benznidazol (5,64 μ M). Os compostos 11 (5,96 μ M) e 12 (4,46 μ M) exibiram atividade equipotente quando comparados ao benznidazol. Em relação à citotoxicidade em macrófagos, alguns dos tiazóis apresentaram baixa citotoxicidade (os compostos 6, 8, 9, 14, 16 e 17 apresentaram CC₅₀ > 44,18 μ M). Os resultados de docking molecular sugerem que os compostos que possuem anéis aromáticos como substituintes, como fenil (compostos 8 e 17) ou naftil (composto 9), apresentaram maior afinidade prevista para o sítio de ligação da cruzaina quando comparados com as moléculas com substituintes não aromáticos. Portanto, essa nova série de 1,3-tiazóis apresentou compostos com potencial promissor para o avanço de estudos pré-clínicos contra doença de Chagas.

Palavras-chave: Tripanossomíase americana, tiazóis, *in silico*, amastigota, tripomastigota

ABSTRACT

Barbalho, M. S. **Anti-*T. cruzi* activity of novel 1,3-thiazole derivatives**. Thesis (Doctorate). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil, 2022.

Chagas disease remains a major public health problem in Latin America, with Brazil leading the number of cases and an estimated 2 million people affected in the country. The treatment is still based on benznidazole, which is more effective in the acute phase and has high toxicity. Therefore, a new series of 1,3-thiazoles (2–17), derived from 2,4-dichlorophenyl thiosemicarbazone or 2,3,4-trichlorophenyl thiosemicarbazone, was investigated through in vitro and in silico assays against the evolutionary forms of *Trypanosoma cruzi*. Against the trypomastigote form, some 1,3-thiazole derivatives showed IC₅₀ values at least 10 times more potent than benznidazole, such as compounds 8 (2.64 µM), 4 (3.27 µM), 10 (4.08 µM), and 16 (4.82 µM). Against the amastigote form, compound 15 exhibited the best IC₅₀ value (3.65 µM), being more active than the reference drug benznidazole (5.64 µM). Compounds 11 (5.96 µM) and 12 (4.46 µM) showed equipotent activity compared to benznidazole. Regarding macrophage cytotoxicity, some thiazoles showed low cytotoxicity (compounds 6, 8, 9, 14, 16, and 17 presented CC₅₀ > 44.18 µM). Molecular docking results suggested that compounds with aromatic ring substituents, such as phenyl (compounds 8 and 17) or naphthyl (compound 9), exhibited higher predicted affinity for the cruzain binding site compared with molecules bearing non-aromatic substituents. Therefore, this new series of 1,3-thiazoles demonstrated promising potential for advancing preclinical studies against Chagas disease.

Key-words: American trypanosomiasis, thiazoles, in silico, amastigote, trypomastigote.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição dos casos de infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> , com base em estimativas oficiais e status da transmissão de vetores, 2018.	19
Figura 2- inseto vetor da DC	20
Figura 3- Formas evolutivas de <i>T. cruzi</i>	21
Figura 4– Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	22
Figura 5 – Fluxograma para diagnóstico laboratorial da doença de Chagas aguda..	24
Figura 6- Fluxograma Fase crônica.....	25
Figura 7– Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento da DC	32
Figura 8 - Estrutura geral dos compostos DGM.	43
Figura 9– Estruturas e pesos moleculares de uma nova classe de compostos tiossemicarbazonas(série DGM).	45
Figura 10 – Mapa do vetor de expressão em <i>T. cruzi</i> . pROCK-GFP-Neo.....	53
Figura 11- Síntese dos compostos propostos	55
Figura 12- Interação entre os compostos da série DGM e a cruzaina	59
Figura 13- As interações intermoleculares que ocorrem nas melhores soluções de docking dos compostos da série DGM e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.....	60
Figura 14- Amplificação do gene da luciferase em duas etapas.	61
Figura 15 - Digestão das clonagens do gene da luciferase.....	62
Figura 16- Confirmação de subclonagem do gene da luciferase no pROCK	63

LISTA DE TABELA

Tabela 1 – Substituintes e pesos moleculares do 1,3-tiazol.....	44
Tabela 2- Citotoxicidade dos compostos DGM em linhagem celular de macrófago RAW 264.7 e atividade tripanocida contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigote de T. cruzi.	56
Tabela 3- Propriedades físico químicas dos compostos DGM (2-17), calculado por Swiss ADMW.....	57
Tabela 4 - Valores de score (ChemPLP) para as soluções de docking dos compostos DGM em seus respectivos isômeros E e Z.	58

LISTA DE QUADRO

Quadro 1- Esquema terapêutico da Doença de Chagas	32
Quadro 2 - Questionamentos sem resposta em relação a DC.....	34
Quadro 3- Perfil do produto alvo contra a doença de chagas	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADME	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BENDITA	Benznidazole New Doses Improved Treatment & Therapeutic Associations
BENEFIT	Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis
BHE	Barreira hematoencefálica
CC50	Concentração citotóxica para 50% das células
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DCA	Doença de Chagas aguda
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNDi	Drugs for Neglected Diseases initiative
DTU	Discreat Type Unit
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IC50	Concentração inibitória para 50% dos parasitos
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
ISe	Índice de seletividade
IV	Índice de variação
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico de Pernambuco
LogP	Coeficiente de partição

LpQM	Laboratório de Planejamento e Síntese em Química Medicinal
MCP	Morte celular programada
NE	Não Encontrado
NK	Natural killer
NR	Não Realizado
OMS	Organização Mundial de Saúde
ON	Óxido nítrico
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PCR	Polymerase chain reaction
PDB	Protein Data Bank
SFB	Soro Fetal Bovino
Tc (I, II, V, VI)	Cepas de Trypanosoma cruzi
TGI	Trato gastrointestinal
Th	T helper
TLR	Toll-like receptor
TNF	Tumor necrosis factor

SUMÁRIO

2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 Aspectos gerais da doença de Chagas	18
2.2 Vetor, hospedeiro e agente etiológico.....	19
2.3 Ciclo Biológico	21
2.4 Diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas	23
2.5 Manifestações clínicas da Doença de Chagas	26
2.6 Aspectos imunológicos da Doença de Chagas.....	27
2.6.1 Infecção Aguda	27
2.6.2 Infecção Crônica	30
2.7 Tratamento da Doença de Chagas.....	31
2.8 Desafio no estudo de drogas eficazes para a Doença de Chagas	34
2.9 Drogas sintéticas e novas abordagens terapêuticas para a doença de Chagas	36
2.10 Gene repórter para teste de descoberta de novos fármacos em larga escala	38
3. JUSTIFICATIVA.....	40
4 OBJETIVOS.....	42
4.1 Objetivo geral	42
5 MATERIAL E MÉTODOS	43
5.1 Compostos.....	43
5.2 <i>Docking</i> Molecular	46
5.3 Animais	47
5.4 Obtenção de esplenócitos murinos.....	47
5.5 Avaliação da atividade citotóxica	48
5.5.1 Células de linhagem macrófaga RAW 264.7	48
5.6 Avaliação da atividade tripanocida.....	48

5.6.1 Epimastigotas	48
5.6.2 Tripomastigotas	49
5.6.3 Amastigotas.....	49
5.7 Análise estatística	50
5.8 Produção de linha transgênica de T. cruzi expressando o gene repórter da luciferase.....	50
5.8.1 Amplificação do gene da luciferase, clonagem e subclonagem	50
6 RESULTADOS.....	54
6.1 Síntese e caracterização química	54
6.2 Avaliação farmacológica	55
6.3 Parâmetros ADME e físico-químicos	57
6.4 Docking molecular	57
6.5 Amplificação e clonagem no vetor pGEMT-easy.....	61
6.5.1 Clonagem em pGEM T- easy.....	61
6.6 Subclonagem no vetor de expressão	62
7 DISCUSSÃO	64
8. CONCLUSÕES	69
9. PESPECTIVAS	70
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO(EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY)	80
ANEXO B - CEUA 102/2016.....	91

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma antroponose que atinge principalmente as populações rurais pobres e uma das patologias parasitárias de mais larga distribuição da América Latina, com impacto social e econômico de peso bem maior do que os efeitos combinados de outras doenças parasitárias como malária, leishmaniose e esquistossomose. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) existem cerca de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas com *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), com 3 a 3,3 milhões de casos sintomáticos e incidência anual de 200 mil casos em 21 países. Estima-se que 75 milhões de pessoas estejam em risco de infecção (Who, 2022; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019).

O agente etiológico da doença de Chagas é o parasito flagelado da família Trypanosomatidae, *Trypanosoma cruzi*, que possui um ciclo evolutivo complexo e compreende diferentes estágios de desenvolvimento. Suas formas evolutivas são epimastigota e tripomastigota metacíclica presentes no inseto vetor, tripomastigota sanguínea circulante, e as formas amastigotas intracelulares obrigatórias. (Tanowitz *et al.*, 1992).

A transmissão se dá, principalmente, através da urina e das fezes de vetores triatomíneos, porém há outras formas de transmissão como por transfusão de sangue contaminado, transplante de órgão, via oral e por via vertical (Faral-Tello *et al.*, 2014).

O curso da doença de Chagas no homem pode apresentar as fases aguda e crônica. O início da fase aguda acontece logo após a entrada do parasita no organismo do hospedeiro (Moncayo e Ortiz Yanine, 2006) e caracteriza-se normalmente por apresentar alta parasitemia.

A fase crônica acontece quando as manifestações clínicas da fase aguda (se presentes) desaparecem e o número de formas tripomastigotas no sangue periférico diminui, chegando a níveis indetectáveis. A resposta imune do hospedeiro é responsável por essa queda da parasitemia sanguínea, principalmente em pacientes não tratados (Cardoni e Antúnez, 2004).

Aldasoro *et al* (2018) afirma:

Nenhuma nova droga foi aprovada nos últimos 40 anos para o tratamento da doença. O tratamento utilizado atualmente é baseado em duas drogas: o benznidazol (produzido pelo LAFEPE como Benznidazol LAFEPE® no Brasil e pela Maprimed/ELEA na Argentina como Abarax®) e o Nifurtimox (Lampit™, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Germany), porém eles são mais efetivos na fase aguda da doença em detrimento da fase crônica, além de possuírem uma alta toxicidade.

Segundo Dias *et al* (2009):

Apenas o tratamento com o benzonidazol é permitido no Brasil. Várias moléculas vêm sendo exploradas em programas de química medicinal com a aplicação de métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor (SBDD – *structure-based drug design*) e na estrutura do ligante (LBDD – *ligand-based drug design*).

De acordo com Clayton (2010):

A cruzaina, também chamada cruzipaina (GP57/51 ou TCC) – alvo dos compostos testados no presente projeto – constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno-proteases de *T. cruzi*, e é a enzima-chave da replicação intracelular do parasita, representando um alvo molecular para o desenho de novos fármacos antichagásicos.

Portanto, no presente projeto, a atividade antiparasitária e os mecanismos celulares e moleculares dos compostos da série 1,3-tiazóis substituídos foram avaliados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

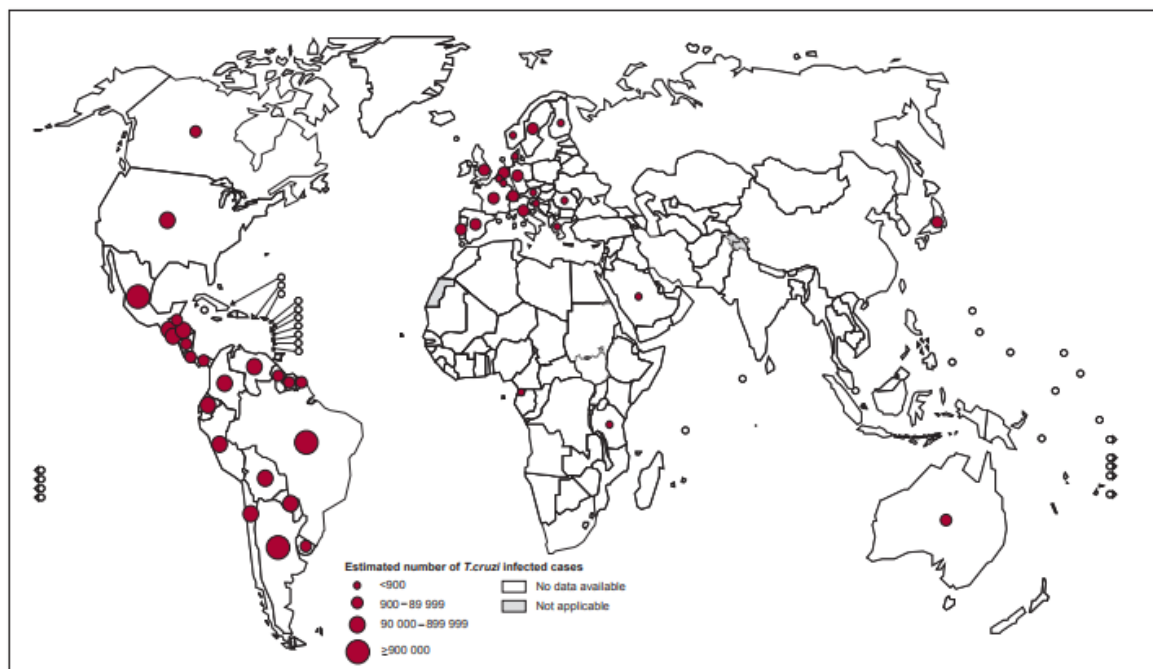
A doença de Chagas (DC), ou tripanossomíase Americana é uma doença tropical negligenciada causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), considerada negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, onde 6 milhões de pessoas infectadas encontram-se em 21 países da América Latina e causa aproximadamente 10.000 mortes por ano na região (Figura 1). Outros 75 milhões de pessoas estão vivendo em área de risco de contrair a infecção. (Dias et al., 2016; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2019; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2019).

No Brasil entre o período de 2012 a 2016, foram registrados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) 19.914 casos suspeitos da doença de Chagas Aguda (DCA), sendo 1.190 (5,9%) confirmados, sendo identificada na maioria dos estados brasileiros. Entretanto, a maior distribuição, cerca de 95%, concentra-se na região Norte. Destes, o estado do Pará é responsável por 83% dos casos. Mesmo com o controle da ocorrência de novos casos da doença na maioria do território nacional, a magnitude da DC no Brasil permanece relevante.

Apesar de não haver dados sistemáticos relativos à prevalência da doença, em estudos recentes as estimativas de prevalência variaram de 1,0 a 2,4% da população, o equivalente a 1,9 a 4,6 milhões de pessoas infectadas por *T. cruzi*. Reflexo disso é a elevada carga de mortalidade por DC no país, representando uma das quatro maiores causas de mortes por doenças infecciosas e parasitárias. (BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

Figura 1- Distribuição dos casos de infecção por *Trypanosoma cruzi*, com base em estimativas oficiais e status da transmissão de vetores, 2018.

Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2018



The boundaries and names shown and the designations used on this map do not imply the expression of any opinion whatsoever on the part of the World Health Organization concerning the legal status of any country, territory, city or area or of its authorities, or concerning the delimitation of its frontiers or boundaries. Dotted lines on maps represent approximate border lines for which there may not yet be full agreement. © WHO 2013. All rights reserved

Data Source: World Health Organization
Map Production: Control of Neglected
Tropical Diseases (NTD)
World Health Organization



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2018.

Legenda: Mapa ilustrando a distribuição geográfica da Doença de Chagas.

2.2 Vetor, hospedeiro e agente etiológico

Os vetores da DC são os insetos hematófagos da ordem Heteroptera, família Reduviidae, mais conhecidos como triatomíneos, devido à denominação da subfamília Triatominae. A espécie mais importante no nosso meio é o *Triatoma infestans* (Figura 2). Os vetores da DC são popularmente chamados de “barbeiros” ou “chupanças”. O motivo mais relevante para a transmissão da doença é o comportamento que estes triatomíneos têm de defecar durante ou logo após a hematofagia, sendo comum a deposição de suas fezes contaminadas com o *T. cruzi*.

Neste momento, as formas infectantes do parasita são transferidas para a circulação do hospedeiro. Os triatomíneos são insetos de hematofagismo que possuem hábitos noturnos. Tal hábito permite um estreito relacionamento com animais reservatórios silvestres e domésticos. Os hospedeiros silvestres são marsupiais, desdentados, roedores, primatas e morcegos de várias espécies. Entre

os hospedeiros domésticos estão o gato, cachorro, rato, coelho e o próprio homem. (Tartarotti *et al.*, 2004).

Figura 2- inseto vetor da DC



Fonte: NovaMais, 2015.

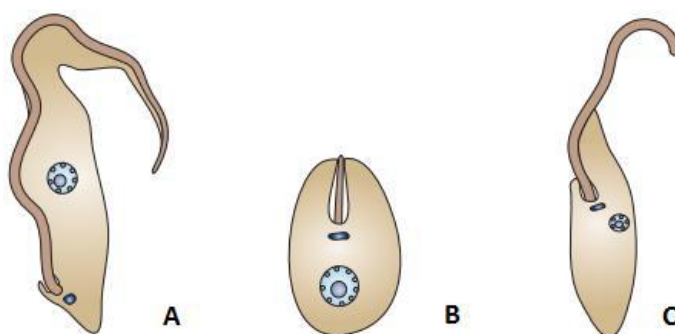
Legenda: *Triatoma infestans*, popularmente conhecido como barbeiro.

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), é o agente etiológico da DC, sendo um protozoário intracelular flagelado que pertence a ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae.

As três formas evolutivas do *T. cruzi* se diferenciam através da posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e a posição do flagelo (figura 3). A forma amastigota, intracelular obrigatória, possui um flagelo rudimentar e o cinetoplasto se localiza entre o núcleo e o flagelo; a forma epimastigota (presente no tubo digestivo do inseto vetor) possui flagelo e cinetoplasto anteriores ao núcleo; a forma tripomastigota (infectiva e sanguínea circulante) possui cinetoplasto posterior ao núcleo e o flagelo torna-se livre na região anterior (TEIXEIRA *et al.*, 2011).

Possui a capacidade de infectar qualquer tipo de célula, principalmente macrófagos, fibroblastos e células epiteliais. A DC foi nomeada em homenagem ao seu descobridor, Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, que constatou o parasita em uma paciente pela primeira vez em 14 de fevereiro de 1909 no estado de Minas Gerais, Brasil. (Lidani *et al.*, 2019; Brener, Z.; Andrade, Z.A.; Barral-Netto, M., 2000).

Figura 3- Formas evolutivas de *T. cruzi*



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

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

O *T. cruzi* se reproduz predominantemente por divisão binária, o que levou à criação da teoria da propagação clonal (Tibayrenc, 1990). Entretanto outros autores discordam da hipótese clonal ao confirmar a existência de cepas híbridas (Westenberger *et al.*, 2005; Freitas *et al.*, 2006; Baptista *et al.*, 2014). As cepas de *T. cruzi* foram classificadas em sete unidades descritas de tipagem (DTUs), TcI- TcVI e Tcbat, as quais foram associadas pela semelhança evolucionária e distribuição geográfica (Ramirez *et al.*, 2017).

2.3 Ciclo Biológico

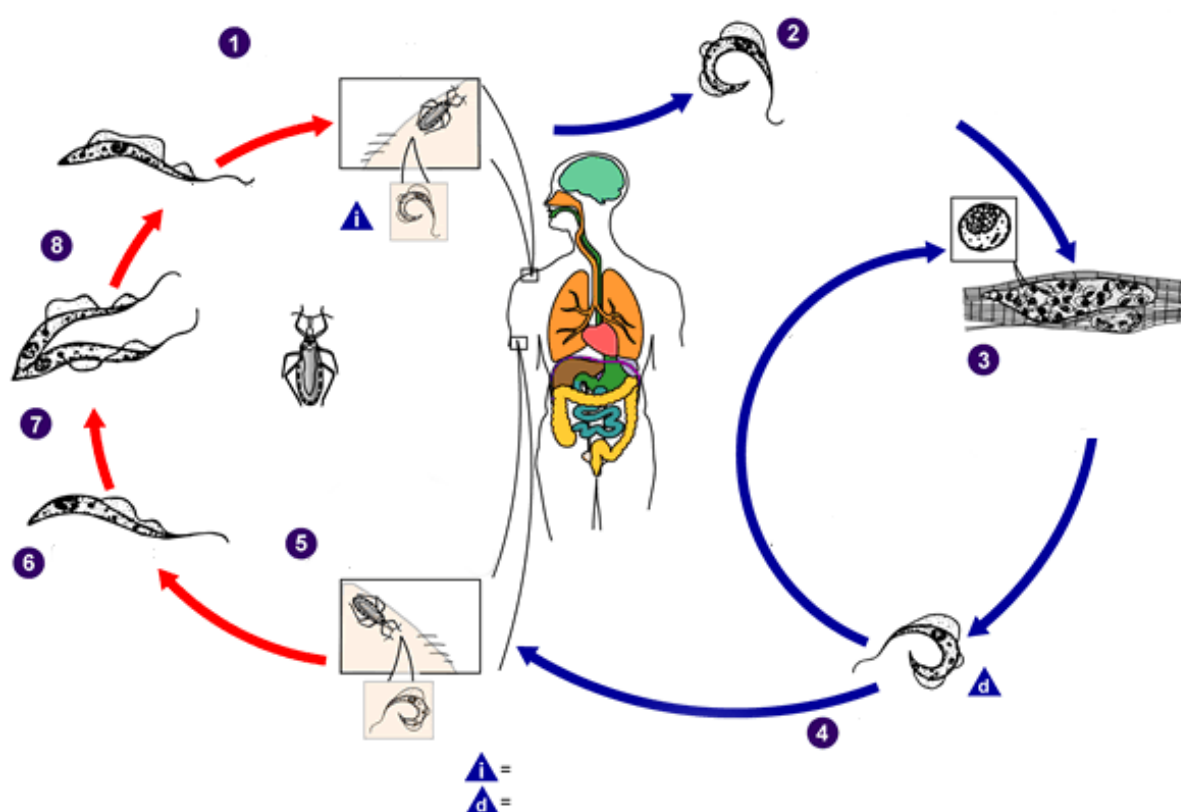
O ciclo de vida do *T. cruzi* começa quando o vetor realiza o repasto sanguíneo em um mamífero infectado e ingere formas tripomastigotas metacíclicas. Os tripomastigotas ingeridos se transformam na forma epimastigota no intestino médio do vetor, se multiplicando através de divisão binária e em seguida, se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos no intestino posterior (figura 4).

A contaminação de um hospedeiro vertebrado ocorre quando o barbeiro infectado pica o mamífero. Neste processo geralmente o inseto defeca e urina, depositando, assim, sobre a pele ou mucosa do mamífero a forma tripomastigota metacíclica, que é a forma infectiva, porém não replicativa. Então quando o hospedeiro se coça, o parasita tem acesso a circulação sanguínea, aderindo e invadindo uma gama de células nucleadas, células musculares e epiteliais. Ao invadirem as células as formas tripomastigotas, se diferenciam em amastigotas, sua

forma intracelular. Multiplicam-se por divisão binária dentro da célula e passam por processo de diferenciação em tripomastigotas sendo

liberadas na corrente sanguínea, que irão infectar outras células em variados tecidos provocando novos locais de infecção e transformando-se em amastigotas novamente. As manifestações clínicas podem variar de acordo com esse ciclo infeccioso (Azambuja; Garcia, 2017).

Figura 4– Ciclo de vida do *T. cruzi*



Fonte: CDC (2014).

Legenda: Ciclo evolutivo: 1 Um inseto vetor triatomíneo infectado ao alimenta-se de sangue, elimina pelas fezes, tripomastigotas próximo do local da picada. Os tripomastigotas entram no hospedeiro através do ferimento da picada ou por mucosas intactas. 2 Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas invadem células próximas ao ponto de entrada onde diferenciam-se nas formas intracelulares, os amastigotas. 3 Os amastigotas multiplicam-se por divisão binária. 4 Então diferenciam-se em tripomastigotas e são liberados na circulação sanguínea. Os tripomastigotas infectam células de uma grande variedade de tecidos e transformam-se em amastigotas intracelulares, num ciclo infectante contínuo. 5 O triatomíneo infecta-se ao ingerir sangue de um hospedeiro vertebrado contendo parasitas circulantes. 6 Os tripomastigotas ingeridos transformam-se em epimastigotas no intestino médio do vetor. 7 Multiplicando-se por divisão binária. 8 No intestino posterior o parasita se diferencia na forma infectante, o tripomastigota metacíclico.

Outras vias de transmissão incluem: transfusões de sangue, transplante de órgãos, durante a gravidez e pela ingestão do inseto acidentalmente triturado junto a alimentos/bebidas (contaminação oral). (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

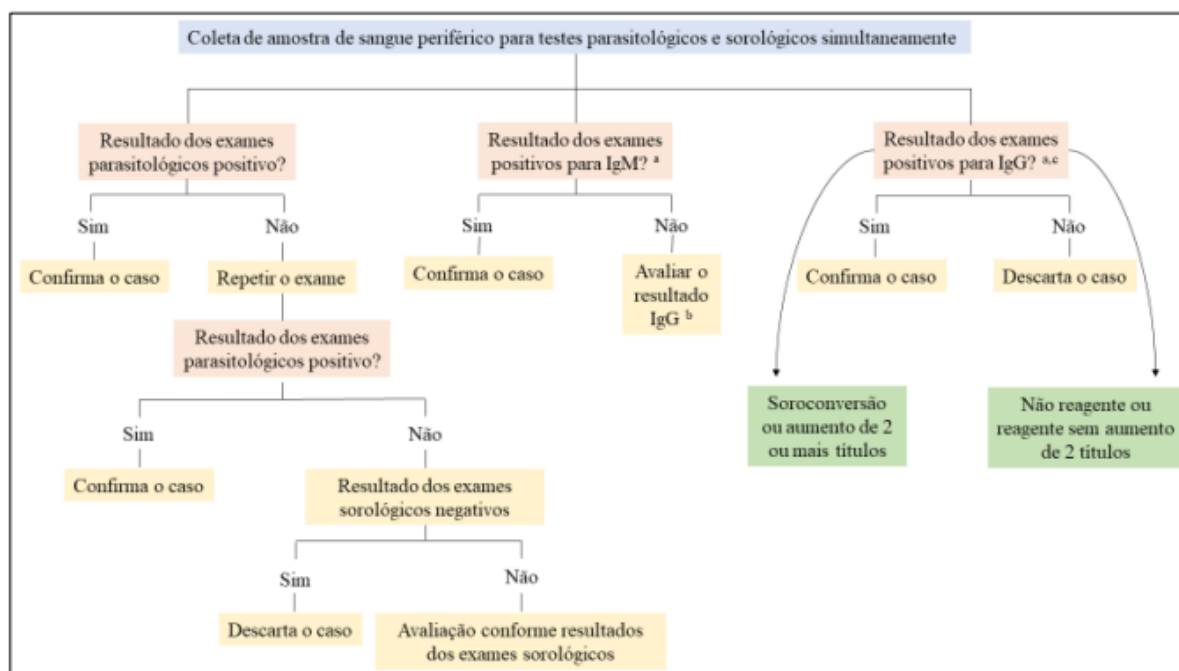
2.4 Diagnóstico laboratorial da Doença de Chagas

O diagnóstico na fase aguda da doença de Chagas é baseado na presença de febre prolongada (mais de 7 dias) e outros sinais e sintomas sugestivos da doença, como fraqueza intensa e inchaço no rosto e pernas, presença de fatores epidemiológicos compatíveis e na observação do parasito presente no sangue dos indivíduos infectados, através de testes parasitológicos diretos como exame de sangue a fresco, esfregaço e gota espessa.

O teste direto a fresco é mais sensível que o esfregaço corado e deve ser o método de escolha para a fase aguda. Caso estes testes sejam negativos, devem ser usados métodos parasitológicos indiretos. Os testes de concentração (micro-hematócrito ou Strout) apresentam 80 a 90% de positividade e são recomendados no caso de forte suspeita de doença de Chagas aguda e negatividade do teste direto a fresco. Em casos sintomáticos por mais de 30 dias, devem ser os testes de escolha, uma vez que a parasitemia começa a declinar (segundo I Consenso Brasileiro em Doença de Chagas do Ministério da Saúde em 2005), revisto em 2015 na forma do II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas.

Muitas vezes, a fase aguda não é diagnosticada porque não há sintomas ou devido à falta de conhecimento dos profissionais de saúde sobre a doença de Chagas. Paralelo a isso, também é feita a sorologia para detecção de imunoglobulinas M (IgM) anti-T. cruzi. Na figura 5, está descrito o fluxograma do diagnóstico laboratorial da doença na fase aguda.

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



Fonte: Adaptado de Brasil (2018).

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

Na fase crônica da doença o diagnóstico parasitológico direto torna-se comprometido em virtude da ausência de parasitemia. Os métodos parasitológicos indiretos (xenodiagnóstico – ou hemocultivo) que podem ser utilizados, apresentam baixa sensibilidade (20-50%).

Sendo assim, a doença é geralmente diagnosticada por detectar IgG que se liga especificamente ao antígeno, *T. cruzi*. Portanto, na fase crônica o diagnóstico é essencialmente sorológico e deve ser realizado utilizando-se dois testes de princípios metodológicos diferentes: um teste de elevada sensibilidade (ELISA com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasito ou a IFI) e outro de alta especificidade (ELISA, utilizando antígenos recombinantes específicos do *T. cruzi*) ou dois testes sorológicos com diferentes preparações antigênicas, ambos os quais devem ser realizados concomitantemente (Gomes, 2017; Lima *et al.*, 2019).

Na figura 6 está descrito o fluxograma do diagnóstico laboratorial na fase crônica da doença.

- Ter familiares ou pessoas do convívio habitual ou rede social que tenham diagnóstico de doença de Chagas, em especial ser filho (a) de mãe com infecção comprovada por *T. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Outra ferramenta importante é a Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para diagnóstico, de acordo com a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (2005), no caso de sorologia inconclusiva. Outras utilidades importantes da técnica são a detecção de reativação da doença em imunossuprimidos cronicamente infectados e detecção em pacientes que receberam órgãos de doadores cronicamente infectados (Qvarnstrom et al., 2012).

2.5 Manifestações clínicas da Doença de Chagas

A DC compreende a fase aguda e a fase crônica da doença. A fase aguda pode ocorrer em qualquer idade, sendo assintomática na maioria dos casos. Os sintomas são geralmente inespecíficos incluindo febre, mal-estar, hepatoesplenomegalia e linfocitose atípica. Em casos raros, o nódulo cutâneo (chagoma) ou edema palpebral prolongado e indolor (Sinal de Romaña), indicam o local de inoculação.

A fase aguda pode durar de 4 a 8 semanas e então ocorre uma diminuição da parasitemia a partir dos 90 dias após a infecção, o controle envolve anticorpos, linfócitos T CD8⁺ (citotóxicos) e linfócitos T CD4⁺ (auxiliares, respostas Th1) produtores de altos níveis de IFN- γ (interferon gama). A doença aguda grave ocorre em menos de 1 a 5% dos pacientes e inclui miocardite aguda e meningoencefalite (risco de mortalidade de 0,2 a 0,5%). (Basso, 2013; Padilla; Bustamante; Tarleton, 2009).

A transmissão oral através de alimentos ou bebidas contaminadas causam maior mortalidade, do que a transmitida pelo vetor (Vargas et al., 2018). Após essa fase aguda, a resposta imune mediada por células controla a replicação do parasita fazendo com que ele regride e os sintomas desapareçam espontaneamente (Rassi et al., 2012). Um terço dos pacientes evoluem para a fase crônica da doença de Chagas a maioria das pessoas permanecem assintomáticas, mas ficarão infectadas por toda a vida (Rassi, 2009).

Nessa fase o paciente é caracterizado por soropositividade para *T. cruzi*, ausência de sinais e sintomas clínicos de comprometimento cardíaco e digestivo,

apresentando radiografia do tórax e eletrocardiograma sem alterações (DIAS, J. C., 1989). Cerca de 30 a 40% dos pacientes infectados na forma crônica, após 10 a 30 anos da infecção aguda podem apresentar megaesôfago/ megacólon ou cardiomiopatia (Bittencourt et al., 1975; Coura *et al.*, 1985).

Essa forma possui como característica histopatológica principal inflamação miocárdica, podendo levar ao aumento do coração (megalocardia), junto com miocitólise e fibrose (Machado *et al.*, 2013). Segundo Cardoso *et al.* (2014) as doenças cardiovasculares ocorrem com mais frequência em pacientes com DC, o acidente vascular cerebral por exemplo, é mais comum duas vezes mais em pacientes Chagásicos.

2.6 Aspectos imunológicos da Doença de Chagas

Existem duas principais hipóteses sobre a patogênese da DC, que foram elucidadas. A primeira baseada na persistência do parasita e a segunda hipótese baseada na resposta imune do hospedeiro à infecção, sendo o papel imunológico relevante tanto na fase aguda como na fase crônica da doença. O papel da resposta imune tem sido relatado nas fases aguda e crônica da doença (Boari *et al.*, 2012; Pérez *et al.*, 2012; Ponce *et al.*, 2012).

2.6.1 Infecção Aguda

A resistência do hospedeiro contra o *T. cruzi* depende tanto da imunidade inata quanto da imunidade adquirida, onde ambas são reguladas por citocinas perfil Th1 (pró inflamatórias). O perfil Th2 está relacionado com a suscetibilidade à doença, onde a principal citocina envolvida é IL-4 (Hiyama *et al.*, 2001). Diferentes tipos de células e moléculas estão envolvidos na resposta imune a infecção por *T. cruzi*. Em geral, a ausência de alguns constituintes da resposta imune acarreta a uma maior suscetibilidade à infecção pelo parasita, resultando em maior probabilidade de parasitemia e mortalidade.

O DNA do *T. cruzi* é reconhecido por receptores específicos, que estimulam macrófagos e células dendríticas a expressarem IL-12, fator de necrose tumoral (TNF) – alfa e óxido nítrico. A citocina IL-12 ativa as células apresentadoras de antígeno e as Natural Killer (NK), a produzir IFN- γ (Gao; Pereira, 2002; Lieke *et al.*, 2006).

Pellegrini e colaboradores (2011), estudaram o papel da IL-12 na resposta imune a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, utilizando camundongos BALB/c infectados com a cepa Tulahuen. Observaram que a administração de IL-12 para camundongos infectados com o *Trypanosoma cruzi* resultou em uma redução na parasitemia e um atraso no tempo de morte destes animais.

Além disso, a neutralização de IL-12 endógena resultou em um aumento na parasitemia, bem como uma diminuição dos níveis séricos de IFN- γ , demonstrando que o efeito protetivo da IL-12 é dependente do IFN- γ e TNF- α . Além disso entender a interação dos compostos com o toll-like receptors (receptores toll-like, TLRs) é importante para estimular a capacidade de resposta das células imunes em responder ao parasito (Rodriguesoliveira-Bellio, 2012).

Os TLRs são uma família de proteínas transmembrana, evolutivamente conservadas entre insetos e humanos que fazem parte de um grupo de moléculas chamado de pattern recognition receptors (receptores de reconhecimento de padrão, PRRs). Ao interagir e reconhecer moléculas chamadas de pathogen-associated molecular pattern (padrões moleculares associados a patógenos, PAMPs) podem induzir resposta imune tanto inata quanto adquirida. Diversas moléculas do parasito têm sido identificadas como PAMPs para os TLRs. (Campos *et al.*, 2001, Ropert; Gazzinelli, 2000).

A atuação da resposta imune inata tem importante papel no combate inicial ao parasito. Estudos mostram aumento da produção de citocinas e quimiocinas, com a atividade de macrófagos, células dendríticas e células natural killer (NK, assassina natural). (Andrade; Gollob; Dutra *et al.*, 2014; Kania *et al.*, 2013; Machado *et al.*, 2008; Pinho *et al.*, 2014; Rezendeoliveira; Sarmiento; Rodrigues-junior, 2012).

O parasito também pode induzir aumento da produção de IL-12, interferindo na produção de IFN- γ pela ativação de células NK e indução de células da resposta Th1 (Kayama; Takeda, 2010). Além disso, essas células NK ativadas por IL-12 levam à expansão de células TCD4⁺ e CD8⁺ pela produção de IFN- γ , as quais produzem mais IFN- γ . Esse último, juntamente com TNF e IL-12, ativa macrófagos que estão infectados com *T. cruzi* a produzir óxido nítrico (ON) e a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) controlando a divisão intracelular do parasito e eliminá-lo (Daff, 2010; Dos-Santos *et al.*, 2016; Gupta; Wen; Garg, 2009; Gutierrez *et al.*, 2009; Silva; Machado; Martins, 2003). No entanto, ON em excesso também pode levar a

danos teciduais, mostrando o seu papel dual e a importância do controle imunológico (Tatakihara *et al.*, 2015)

Além da resposta imune inata, a resposta imune adaptativa é de extrema importância e vem sendo elucidada (Basso, 2013; Padilla; Bustamante; Tarleton, 2009). Tarleton e colaboradores (2002) mostraram que as células T CD4 + do tipo Th1 são importantes para controlar a infecção por *T. cruzi*, enquanto as do tipo Th2 contribuem para a persistência do parasita e aumentam a gravidade da doença. Na literatura podemos verificar vários trabalhos abordando a importância da citocina IFN- γ , que é a principal citocina do tipo Th1, na resistência à infecção por *T. cruzi*, tanto em modelos animais, quanto em seres humanos apresentando as formas indeterminada e cardíaca da DC.

Torrico *et al.* (1991), demonstraram que animais resistentes se tornam susceptíveis quando tratados com anticorpos anti-IFN- γ . A IFN- γ , tem a capacidade de ativar macrófagos impedindo a proliferação do *T. cruzi*, juntamente com o auxílio de TNF- α , ativando a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (NOSi), que desta forma produz óxido nítrico (NO), para a atividade microbicida a partir da produção de metabólitos reativos do oxigênio (Souza *et al.*, 2007; Lieke *et al.*, 2006; Chandra *et al.*, 2002). O óxido nítrico (ON), produzido sobretudo por macrófagos dependentes de IFN- γ , é um dos importantes agentes tripanocidas. As citocinas regulatórias IL-10 e TGF- α inibem in vitro a produção de ON e a atividade tripanomicida de macrófagos infectados e ativados por IFN- γ (Gazzinelli *et al.*, 1992).

Recentemente, Andrade; Magalhães; Pessina, 2012, observaram a importância do TNF- α no desenvolvimento da fase aguda da doença de Chagas em camundongos, neste estudo puderam observar que apesar desta citocina ser importante na sobrevivência do animal por favorecer a diminuição da parasitemia, em contrapartida, induziria a necrose de órgãos como o coração, elevando a taxa de mortalidade destes animais.

Em diversos estudos as citocinas de perfil Th2 apresentam-se como importantes fatores na regulação da resposta imune, mas por outro lado poderiam favorecer o crescimento do parasita e sua disseminação tecidual (Souza *et al.*, 2007).

Apesar de toda essa resposta imune desenvolvida para que haja o combate ao parasito, muitos pacientes evoluem da forma aguda para a forma crônica da doença. Alguns dos fatores envolvidos nessa evolução são a evasão de *T. cruzi*

ao sistema imune, a cepa envolvida na infecção inicial e o sistema imune do hospedeiro (Magalhães *et al.*, 2015; Nagajyothi *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2010).

Um estudo com duas cepas de dois DTUs diferentes (Tcl e TcII) na infecção aguda demonstrou que a cepa Col cl1.7, pertencente a Tcl, levou a uma maior ativação de monócitos e produção de IL-10, enquanto a cepa Y, pertencente a TcII, ativa menos os monócitos, no entanto, causa uma maior produção de citocinas pró-inflamatórias por células periféricas mononucleares (Magalhães *et al.*, 2015).

DTU é um conjunto de unidades populacionais geneticamente mais semelhantes entre si do que a qualquer outra unidade e podem ser identificados por marcadores genéticos/moleculares/imunológicos comuns (Tibayrenc, 2003).

2.6.2 Infecção Crônica

Na fase crônica, a resposta imunológica estar diretamente ligada aos sinais e sintomas do paciente, ou até mesmo a ausência dele. Na forma cardíaca há o perfil Th1 de citocinas (IFN- γ , TNF, IL-2, IL-6, IL-9, IL-12) com baixo nível de citocinas do perfil Th2 (IL-4, IL-5, IL-10, IL-13), enquanto na forma indeterminada é totalmente contrário. (Dutra *et al.*, 2009; Poveda *et al.*, 2014).

Estudos relatam, que o infiltrado inflamatório encontrado no tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia por DC forma crônica, contém macrófagos, linfócitos T CD8+ e linfócitos T CD4. As células de perfil Th1, expressam IFN- γ que suprimem citocinas IL-4 expressas por células Th2, e também elevados níveis plasmáticos de TNF- α corroboram com essa supressão.

Além disso, células mononucleares do sangue periférico de pacientes crônicos produz mais IFN- γ e menos IL-10, reforçando a hipótese de que os pacientes com cardiomiopatia por doença de Chagas exacerbam uma resposta imune de perfil Th1 (Bilate; Cunha-Neto, 2008). Da mesma maneira, os estudos de Sardinha e colaboradores (2006) e Reyes e colaboradores (2006), demonstram que a deficiência das citocinas Th1 como IFN- γ , TNF- α e IL-12, além dos macrófagos, em camundongos é fator importante de susceptibilidade à infecção, assim como no estudo de Ferraz e colaboradores (2007), que demonstrou a importância destas citocinas para o melhor resultado do tratamento da doença com as drogas Posaconazole e Benzonidazol.

A citocina IL-6 também apresenta papel interessante no que diz respeito a resistência e sinalização de comprometimento causados pelas lesões cardíacas na doença de Chagas, verificou-se que os níveis desta citocina elevados favoreciam os animais infectados por diminuir o pico de parasitemia, no entanto, havia uma migração maior de parasitas para o tecido cardíaco (Gao; Pereira, 2002).

Por outro lado, níveis elevados dessa citocina associada a maiores níveis séricos de proteína C reativa poderiam estar relacionados a maior gravidade de lesões no parênquima cardíaco de indivíduos do sexo masculino (López *et al.*, 2006).

Em relação a forma indeterminada, há um aumento da expressão de citocinas e fatores de transcrição relacionados aos perfis Th2, Th9, Th22 e Treg, associado há uma expressão reduzida das citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF (Guedes *et al.*, 2016; Souza *et al.*, 2017).

Há uma correlação entre a produção de citocinas inflamatórias por células T CD4+ e monócitos de pacientes com a forma cardíaca (Souza *et al.*, 2007). Isso indica que as citocinas anti-inflamatórias podem ajudar a neutralizar a ação das citocinas pró-inflamatórias e consequentemente podem levar a redução dos danos teciduais (Gomes *et al.*, 2002; Villani *et al.*, 2010).

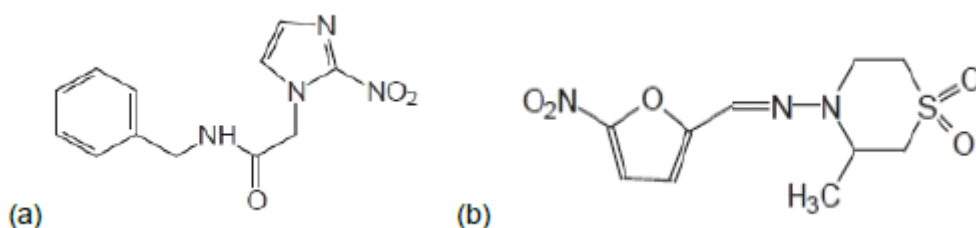
Apesar da quantidade de perfis imunológicos que estão envolvidos na resposta imune a doença de DC, há a importância de estudar de que maneira um possível novo tratamento irá auxiliar o sistema imunológico, ajudando na proteção e combate a doença.

2.7 Tratamento da Doença de Chagas

Os primeiros compostos testados experimentalmente para o tratamento da DC, foram arsênico, fucsina, antimonial pentavalente e cloreto de Mercúrio, empregados experimentalmente por Mayer e Rocha Lima (1912- 1914) e todos sem resultados efetivos (Coura; Castro, 2002).

O tratamento é baseado em duas drogas descoberta no final dos anos 1960 e 1970 respectivamente, o Nifurtimox (Lampit™, Bayer HealthCare AG, Leverkusen, Alemanha) e o benzonidazol (produzido pelo LAFEPE como Benznidazol LAFEPE® no Brasil e pela Maprimed/ELEA na Argentina como Abarax®). Ambos possuem maior efetividade na fase aguda da doença em detrimento da fase crônica, além de possuírem uma alta toxicidade (figura 7) (Morilla; Romero, 2015).

Figura 7– Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento da DC



Fonte: Bosquesi et al., 2008.

Legenda: (a) Benzonidazol e (b) Nifurtimox.

Segundo o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (2019) os efeitos colaterais mais comuns no tratamento com benzonidazol incluem: dermatite alérgica, neuropatia, anorexia e insônia. Os efeitos colaterais mais comuns do nifutimox incluem: anorexia, perda de peso, polineuropatia, náusea, vômito, dor de cabeça e tontura. Nenhuma droga foi aprovada nos últimos 40 anos para o tratamento da doença (Bellera *et al.*, 2015).

De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (2016), o tratamento é indicado para todas as pessoas com infecção aguda, infecção congênita, imunossuprimidos e crianças com a forma crônica da doença (quadro 1).

Quadro 1- Esquema terapêutico da Doença de Chagas

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

Fonte: Adaptado de Centers for *Disease Control and Prevention* (2019).

Apesar do seu potencial de salvar vidas, menos de 1% dos pacientes com doença de Chagas recebem tratamento etiológico. Uma grande preocupação é a ocorrência de efeitos colaterais como já citado anteriormente, que são mais frequentes e graves à medida que a idade dos pacientes aumenta.

Assim, há uma grande urgência em melhorar o perfil de tolerabilidade dos tratamentos atuais e identificar a dosagem e duração ideais do regime, bem como desenvolver alternativas mais seguras e eficazes. Isso facilitará a adoção dos medicamentos para a doença de Chagas nos sistemas de saúde pública dos países afetados (Batista C. *et al.*, 2018).

No ano de 2011 uma significativa inovação para a população pediátrica afetada por Chagas foi alcançada. Foi desenvolvido e lançado o benzonidazol na dosagem 12.5mg, incluído na Lista de Medicamentos Essenciais da OMS. Ainda que o tratamento com benzonidazol fosse recomendado para crianças, os comprimidos eram apenas disponíveis na dosagem de 100mg para adultos. Nessa formulação, é necessário o fracionamento do comprimido em até 12 pedaços para o tratamento de crianças pequenas, o que muitas vezes resulta em dosagem inadequada e imprecisa.

A parceria da DNDi com o Lafepe (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco) possibilitou o desenvolvimento da primeira formulação em dosagem pediátrica, adaptado à idade e fácil de usar. Considerando a eficácia do tratamento etiológico em população pediátrica e maiores chances de cura da infecção neste grupo, considera-se de grande importância assegurar a adoção e ampliação ao acesso ao tratamento para esta população (Batista C. *et al.*, 2018; *DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE*, 2019).

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

Visando avaliar a eficácia, segurança e perfil de efeitos adversos do posaconazol, foi desenvolvido o estudo clínico prospectivo e randomizado denominado CHAGASAZOL. No entanto, significativamente mais pacientes nos grupos tratados com o posaconazol do que no grupo tratado com o benzonidazol tiveram falha no tratamento durante o estudo (Molina *et al.*, 2014). Outro estudo mais recente, o New ThErapiEs and Biomarkers for ChagaS infEctiOn (TESEO) visa comparar a segurança e eficácia de dois novos regimes de quimioterapia de benzonidazol e nifurtimox em adultos com a doença de chagas crônica com o tratamento padrão atual, avaliados por PCR em tempo real e biomarcadores por 36

meses 41 pós-tratamento e correlacionados com a sorologia convencional da doença de Chagas. (Alonso-Vega, 2021). Esse ensaio clínico ainda está em desenvolvimento.

Devido a esses aspectos, é notável a necessidade de continuar pesquisando novos tratamentos que tenham eficácia e baixa toxicidade, fácil acesso e que tenha resposta em ambas as fases da doença.

2.8 Desafio no estudo de drogas eficazes para a Doença de Chagas

Há um urgente desafio no desenvolvimento de novos tratamentos eficazes e seguros para ambas as fases da DC, desde baixo investimento até a falta de padronização metodológica entre os grupos de pesquisa. Não há consenso sobre os protocolos adequados de triagem *in vitro* e *in vivo*, bem como a falta de biomarcadores para prever o risco de pacientes da progressão para a doença crônica, ou para avaliar a eficácia do tratamento e da cura. (Chatelain E., 2014).

A tarefa de projetar e desenvolver novos compostos para a DC é prejudicada de diversas maneiras diferentes. Como o fato das interações parasito- hospedeiro e a relevância das variadas cepas de *T.cruzi* na etiologia da doença ainda não serem totalmente compreendidas. As ferramentas disponíveis para testes *in vitro* e *in vivo* em modelos animais experimental ainda tem um baixo valor preditivo, que afeta na compreensão das relações farmacocinéticas/ farmacodinâmicas para DC, durante o processo de descoberta do medicamento (Chantelain E.; Konar N., 2015). Também há dificuldade de padronização de testes *in vivo* e *in vitro* para o *screening* dos compostos. (Pinazo *et al.*, 2014; Romanha *et al.*, 2010).

O desenvolvimento de drogas contra a DC é dificultado por vastas questões ainda não respondidas (quadro 2).

Quadro 2 - Questionamentos sem resposta em relação a DC.

Modelos de doença	Desenho do experimento (eficácia final, comparadores, esquemas de tratamento)
Como a variabilidade observada em diferentes modelos animais poderia ser diminuída?	Qual é a importância do tempo de início do tratamento, regime de dosagem e duração do tratamento?

A eficácia de um composto em um modelo agudo validado pode ser aplicada com sucesso em um modelo crônico da doença?	Como se definiria cura em um modelo de escolha?
Modelos de doença crônica envolvendo cepas de <i>T. cruzi</i> menos suscetíveis ao benzonidazol são melhores?	Quais seriam os melhores compostos ou controles utilizados para comparação que deveriam ser usados em modelos animais selecionados para validar os testes dos compostos e extrapolar para o homem?
A avaliação <i>in vitro</i> da eficácia de um composto contra um painel de cepas representativas do parasito pode ser uma substituta para testes <i>in vivo</i> em modelos animais com as mesmas cepas?	-

Fonte: Adaptado de Chatelain e Konar (2015).

Como forma de promover e estabelecer novas ferramentas responsáveis pela padronização de diferentes perfis de produtos esperados, mesmo em variadas condições de uso, a Organização Pan-Americana da saúde (OPAS), em colaboração com a DNDi, Médicos Sem Fronteiras e o Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais, convocou um grupo do Rio de Janeiro, Brasil (abril 2010), para discutirem e promoverem encontros para desenvolvimento e debate de *Target Product Profile* (TPP, Perfil do Produto-Alvo) para a Doença de Chagas, tanto para a fase aguda da doença quanto para a crônica (quadro 3).

Nos últimos cinco anos, o TPP para a doença de Chagas foi atualizado algumas vezes até chegar à versão atual, validada na reunião da Plataforma de Pesquisa Clínica em Doença de Chagas de março de 2010, realizada em Buenos Aires, Argentina. (Porrás *et al*, 2015; PLATAFORMA DE PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 2011).

Quadro 3- Perfil do produto alvo contra a doença de chagas

Novo tratamento para adultos e crianças contra as fases aguda e crônica	-A prioridade é uma formulação pediátrica - Útil frente aos tipos de parasita presentes em todas as regiões
Perfil de maior segurança que o dos medicamentos existentes e que idealmente precise de pouco ou nenhum monitoramento clínico e laboratorial	
Perfil de eficácia igual ou superior a dos medicamentos existentes	
Facilidade de uso	- Idealmente por menos de 30 dias - Uso oral preferencialmente uma vez ao dia - Idealmente sem internação
Economicamente acessível	
Estável em climas tropicais	

Fonte: Adaptado PLATAFORMA DE PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇA DE CHAGAS, 2011

Dados todos os problemas em relação ao tratamento e desafios de novos compostos tripanocidas, também é necessário procurar alternativas que sejam eficientes. Os principais alvos dos grupos de pesquisas para a busca de alternativas são produtos de origem natural, “screening” de bibliotecas de compostos, caracterização de enzimas do parasita, busca de inibidores específicos e o reposicionamento de fármacos, além de esquemas de combinação de drogas.

2.9 Drogas sintéticas e novas abordagens terapêuticas para a doença de Chagas

As pesquisas por novos fármacos para o tratamento da doença de Chagas têm evoluído sensivelmente nas últimas décadas, com destaque para o sequenciamento dos genomas do *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* (Duschak et al., 2007; Mckerrow et al., 2008; Moreira et al., 2009) que permitiu a identificação de vários genes, muitos deles existentes apenas no parasita e não no homem.

Além disso, várias moléculas pequenas vêm sendo exploradas em programas de química medicinal com a aplicação de métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor (SBDD - *structure-based drug design*) e na estrutura do ligante (LBDD - *ligand-based drug design*). As inovações científicas e tecnológicas têm contribuído fortemente no direcionamento do processo moderno de P&D na área de doenças negligenciadas (Dias et al., 2009).

Além dos diversos avanços, o sequenciamento do genoma do *T. cruzi* também contribui com a identificação de diversos alvos biológicos promissores, sendo a maior

parte deles enzimas (Duschak *et al.*, 2007; Mckerrrow *et al.*, 2008; Soeiro M. N. C.; Castro S. L., 2009).

Alguns dos alvos mais explorados são as: proteases, esteróis, via glicolítica, lipídeos, quinases, organelas celulares, entre outros.

Os esteróis, no caso dos organismos unicelulares, são essenciais ao crescimento celular. O principal esterol para o crescimento do *T. cruzi* é o ergosterol, o que torna, portanto, a via de biossíntese desse lipídeo um alvo atrativo para o desenvolvimento de fármacos (Andricopulo *et al.*, 1998).

Em relação a via glicolítica estas formas infectivas são altamente dependentes da mesma como fonte de energia através da produção de ATP, está se torna, portanto, um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos para a doença de Chagas (Verlline *et al.*, 2001; Souza *et al.*, 2008). Podem-se destacar ao menos três enzimas que têm sido bastante exploradas como alvos biológicos: a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a hexoquinase, e a fosfofrutoquinase (Urbina, J. A.; Crespo, A., 1984).

As proteases são enzimas que quebram ligações peptídicas entre aminoácidos de proteínas e peptídeos. Se não houvesse essa participação catalítica, não seria possível ocorrer a hidrólise de um simples peptídeo (Sajid, M.; Mckerrrow, J. H., 2002). Em protozoários como o *T. cruzi*, as proteases possuem múltiplas funções que envolvem desde a invasão celular até o escape do parasita do sistema imune do hospedeiro (Soeiro, M. N. C.; Castro, S. L., 2009).

Considerando-se o papel essencial dessa classe de enzimas no ciclo de vida do *T. cruzi*, algumas proteases têm sido selecionadas como alvos para o desenvolvimento de novos agentes tripanocidas. Cisteíno proteases, serino proteases, metaloproteínas e treonino proteases são exemplos de proteases amplamente estudadas (Sajid, M.; Mckerrrow, J. H., 2002; Soeiro, M. N. C.; Castro, S. L., 2009).

Dentre estas, a cruzaina, também chamada cruzipaina ou GP57/51, alvo dos compostos testados no presente projeto, que constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno proteases do *T. cruzi* sendo a enzima chave de replicação intracelular do parasita, tem sido muito explorada levando à descoberta de vários inibidores potentes e seletivos. Das patentes depositadas através da Organização Mundial da Propriedade Intelectual (WIPO - *World Intellectual Property Organization*)

sobre moduladores de rotas metabólicas do *T. cruzi*, os inibidores de cruzaina merecem especial destaque.

As principais classes de inibidores desta enzima incluem: derivados peptídicos (Sealey-Cardona, 2007); derivados não-peptídicos (triazóis, pirimidinas, tiossemicarbazonas e chalconas (Sealey-Cardona, 2007; Zanatta, N. *et al.*, 2008); complexos de rênio e ouro (oxorênios e ciclometalados de ouro (Fricker, S. P. *et al.*, 2008); e doadores de óxido nítrico (nitrosotióis e nitrosilo complexos de ferro e rutênio) (Ascenzi, P. *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2007).

Uma gama de estudos tem descrito a potente atividade inibitória de tiossemicarbazonas frente ao *T. cruzi*. Du e colaboradores (2002) descreveram a 3'-bromopropilfenonattiossemicarbazona e a 3,4-dicloroacetofenona como uns dos mais eficazes inibidores da cruzaina, com atividade tripanocida em níveis que não são tóxicos para células de mamíferos.

Tantos derivados de tiossemicarbazonas como 4-tiazolinonas possuem atividade antitumoral, antibacteriana, antifúngica e como agente antiprotozoários (Espíndola *et al.*, 2015; Gupta *et al.*, 2016; Henandes *et al.*, 2010; Leite *et al.*, 2007; Kobylnska *et al.*, 2016; Moreira *et al.*, 2012; Tenório *et al.*, 2005).

Os triazóis têm despertado o interesse dos químicos medicinais por causa de suas atividades biológicas. O núcleo tiazol é altamente eficaz para o tratamento de doenças fungicas e tem efeitos supressores contra infecções por *T. cruzi* em experiências com seres humanos ou animais (Graebin *et al.*, 2009). Caputto e colaboradores (2011) desenvolveram uma série de compostos com função de tiazol na sua estrutura, os quais apresentaram 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.

Baseado nisto, foi planejado uma série inédita de 17 compostos tiazolinonicos, série DGM, no qual para o planejamento da série de tiazolinonas trocou-se bioisostericamente o heterociclo tiazolidin-4-ona pelo 1,3-tiazol, ocorrendo as substituições na posição C4 do anel tiazol, os quais foram realizados seus parâmetros físico-químicos.

2.10 Gene repórter para teste de descoberta de novos fármacos em larga escala

Os genes repórteres permitem visualizar o seu produto de expressão (produtos fluorescentes ou corados) e têm uma série de características que favorecem a sua função como: ausência de produção endógena, proteína sintetizada sem interação fisiológica na célula hospedeira e atividade protéica medida de forma simples, rápida e sensível (Dube *et al.*, 2009).

Esta tecnologia é uma ferramenta muito utilizada para monitorar o crescimento e a proliferação de bactérias, vírus e outros parasitas em estudos *in vitro* (Ashutosh *et al.*, 2005). É também uma técnica promissora em estudos de progressão de doenças em modelos experimentais *in vivo*. Os principais genes repórteres utilizados são a B-galactosidase, a proteína verde fluorescente (GFP) e a luciferase.

A luciferase é uma potente molécula repórter utilizada em triagens biológicas, codificada pelo gene *luc*, clonado do vaga-lume (*Photinus pyralis*), catalisa uma reação de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP, Mg^{2+} e O_2 . Na presença desses reagentes e mediante a ação da luciferase presente no lisado de células, ocorrerá uma reação de oxidação da luciferina com emissão de um *flash* de luz que decai rapidamente. O sinal luminoso é detectado por um luminômetro. A emissão total de luz é proporcional à atividade da luciferase na amostra que, por sua vez, reflete a taxa de transcrição do gene "repórter" sob ação do promotor em estudo (Lin; Barbosa, 2002).

O sistema *luc* tem algumas vantagens quando comparado aos outros sistemas usualmente empregados: apresenta uma sensibilidade 10 a 100 vezes superior, o processamento das amostras é bem mais rápido, não requer o uso de isótopos, apresenta atividade endógena desprezível em células de mamíferos.

Além de diminuir os erros manuais, possui alta reprodutibilidade, pode ser utilizada em testes de descobertas de novos fármacos em larga escala e como é distinguida facilmente das proteínas endógenas, pode ser utilizada como método de quantificação parasitária em experimentos *in vitro* e acompanhar a progressão da doença, como a determinação da carga parasitária em experimentos *in vivo*. O seu ponto negativo é o alto custo do reagente para realizar a ação (Pazzagli M *et al.*, 1992; Lin, C. J.; Barbosa, A. S., 2002).

Visando a melhoria do *screening* de compostos reduzindo sua escala de tempo em comparação com outros métodos convencionais, o presente estudo iniciou o desenvolvimento de uma linhagem repórter de *T. cruzi* que expressa a luciferase de pirilampo (*luc*) e a sua utilização em sistemas de *screening* de drogas *in vitro*. (Bustamante; Tarleton, 2011; Canavaci *et al.*, 2010; Kessler *et al.*, 2010).

3. JUSTIFICATIVA

As doenças endêmicas parasitárias representam um grave problema médico, social e humano e sua prevenção, controle e tratamento representam um grande desafio mundial. Por outro lado, do ponto de vista científico, as oportunidades de estudos na área de planejamento de fármacos são promissoras, especialmente nas últimas décadas com os avanços da biologia molecular e estrutural, bem como da química medicinal e computacional, da síntese orgânica planejada e dos ensaios biológicos em larga escala.

O considerável investimento requerido no desenvolvimento de novos fármacos, aliado à perspectiva de retornos financeiros insuficientes, tem como resultado a quase inexistência de recursos em P&D na área de doenças parasitárias por parte das principais companhias farmacêuticas e biotecnológicas do mundo. Outro fator interferente é a falta de protocolos definidos para que um composto seja considerado um candidato ao desenvolvimento clínico (Romanha *et al.*, 2010).

Estudos têm sugerido que o envolvimento do sistema imune de hospedeiros infectados com *Trypanosoma sp.* pode desempenhar um importante papel na eficácia da quimioterapia (Albareda, 2015).

Do mesmo modo que também é importante relacionar com a apoptose celular, visto que drogas potenciais para tratar infecções parasitárias devem ser capazes de eliminar o parasita e limitar os danos nas células do hospedeiro (Jimenez *et al.* 2008; Menna-Barreto *et al.* 2009; Menna-Barreto; Castro, 2014)

Andriani *et al.* (2011):

Então o desenvolvimento de ensaios *in vitro* para avaliação da atuação dos compostos é essencial, visto que formas evolutivas de *T. cruzi* podem ser facilmente obtidas através de cultura de células e a eficácia do medicamento pode ser determinada usando uma variedade de abordagens, incluindo o espectrofotômetro ou avaliação fluorométrica de crescimento do parasita.

Sendo assim, compostos desenhados por modificações estruturais ou por analogia estrutural a fármacos e/ou protótipos com conhecida ação antiparasitária (1,3-tiazóis substituídos) foram investigados *in vitro* quanto à ação anti-*T. cruzi* em ensaios sobre as formas evolutivas desse parasito.

Além disso, visando a melhoria do *screening* de compostos reduzindo sua escala de tempo em comparação com outros métodos convencionais, o presente estudo inciou o desenvolvimento de uma linhagem repórter de *T. cruzi* que expressa

a luciferase de pirilampo (*luc*) e a sua utilização em sistemas de *screening* de drogas *in vitro*. A atividade da enzima luciferase expressa pelo parasita transgênico pode ser detectada por luminometria e a intensidade de luminescência pode ser facilmente quantificada utilizando-se o leitor de placas (luminômetro).

O uso dos métodos descritos acima evidenciam como novas ferramentas podem contribuir na melhoria do rendimento da descoberta do potencial tripanocida de drogas *in vitro* (Bustamante; Tarleton, 2011; Canavaci *et al.*, 2010; Kessler *et al.*, 2010).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Contribuir para a compreensão do mecanismo de ação de compostos 1,3-tiazóis substituídos com potencial ação tripanocida.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade citotóxica de substâncias obtidas por meio sintético;
- Determinar *in vitro* a atividade antiparasitária das substâncias avaliadas sobre formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*;
- Avaliar características físico-químicas e de Absorção, Distribuição, Metabolismo e Excreção (ADME) dos compostos utilizando ferramentas computacionais para predição dessas características;

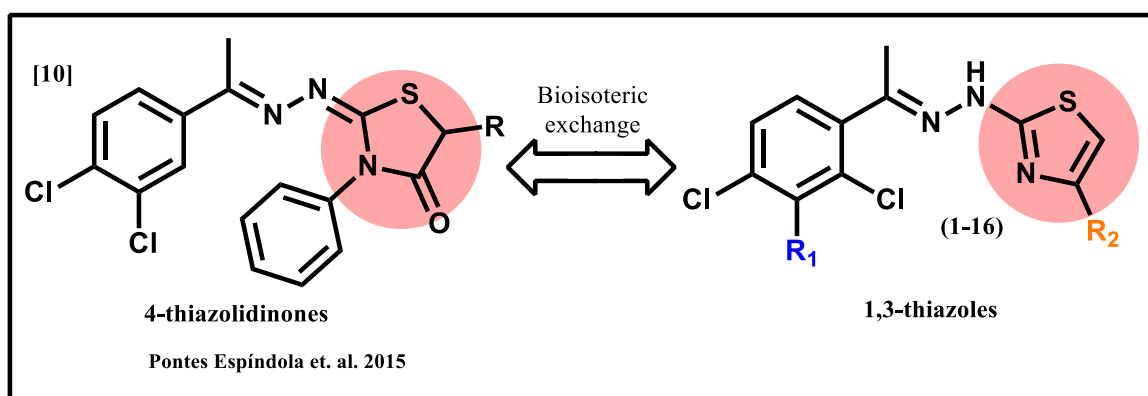
;

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Compostos

Os dezesseis compostos testados da série DGM foram sintetizados com colaboração com o laboratório de Laboratório de Síntese de Fármacos do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE. A estrutura geral dos compostos está descrita na figura 8 e os substituintes e peso molecular de cada composto estar descrito na tabela.1.

Figura 8 - Estrutura geral dos compostos DGM.



Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: Estrutura geral dos compostos DGM.

Tabela 1 – Substituintes e pesos moleculares do 1,3-tiazol

Compostos	R₁	R₂	PM (g/mol)
DGM 2	Cl	Ph	396,72
DGM 3	Cl	4-F-Ph	414,71
DGM 4	Cl	4-Cl-Ph	431,17
DGM 5	Cl	4-MeO-Ph	426,75
DGM 6	Cl	4-NO ₂ -Ph	441,72
DGM 7	Cl	3,4-diCl-Ph	465,61
DGM 8	Cl	4-Ph-Ph	472,82
DGM 9	Cl	2-Naphtyl	446,78
DGM 10	Cl	2,4-diCl-Ph	465,81
DGM 11	Cl	4-Br-Ph	475,62
DGM 12	Cl	3- NO ₂ -Ph	441,72
DGM 13	H	Ph	489,64
DGM 14	H	4-Cl-Ph	362,27
DGM 15	H	4-MeO-Ph	396,71
DGM 16	H	3,4-diCl-Ph	392,30
DGM 17	H	4-Ph-Ph	410,75

Fonte: Elaborada pela autora, 2022.

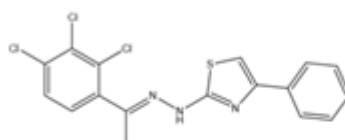
Suas estruturas estão expostas na figura 9. Os compostos foram solubilizados em DMSO (dimetilsulfóxido) e estocados a -20°C. Para os ensaios, cada composto foi diluído na concentração apropriada utilizando-se o meio de cultura adequado.

Figura 9— Estruturas e pesos moleculares de uma nova classe de compostos tiossemicarbazonas (série DGM).

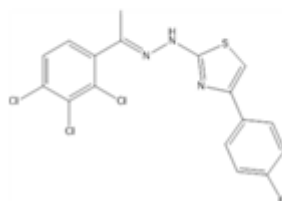
Código

Estrutura

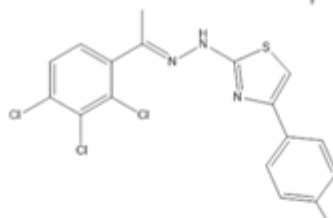
2



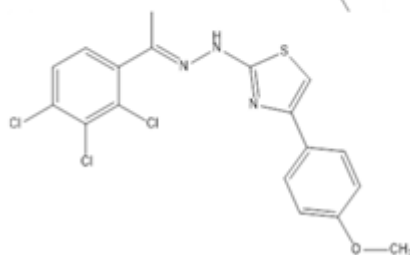
3



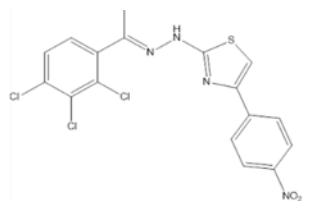
4



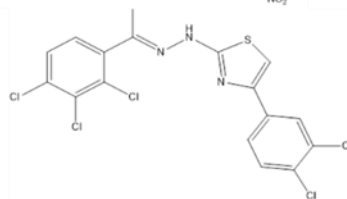
5



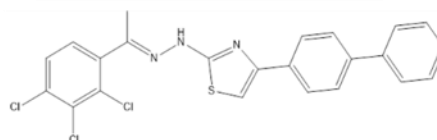
6



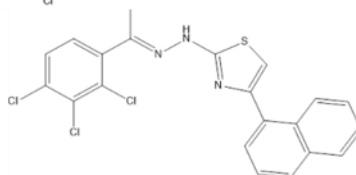
7



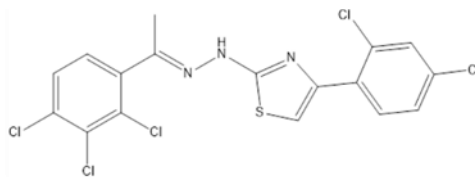
8



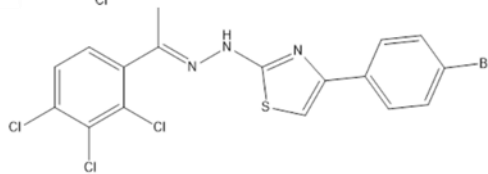
9



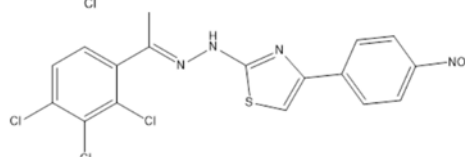
10



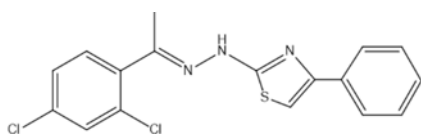
11



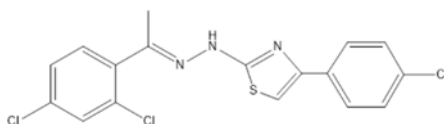
12



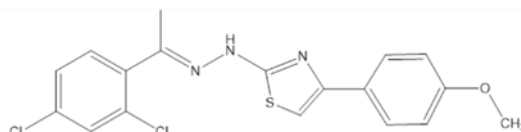
13



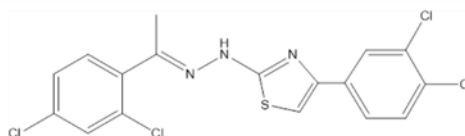
14



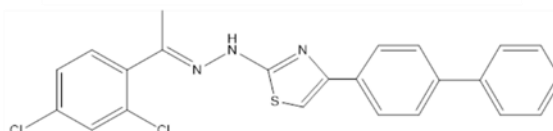
15



16



17



Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

5.2 Docking Molecular

As estruturas de todos os compostos foram desenhadas utilizando-se o programa SPARTAN 08' (Wavefunction, Inc.) e a otimização de cada estrutura foi realizada utilizando o método RM1 (ROCHA *et al.*, 2006) disponível como parte do programa SPARTAN 08', usando as configurações padrão para o critério de convergência. Os cálculos de *docking* molecular foram realizados utilizando-se a

enzima cruzafina do parasita *T. cruzi* como alvo biológico (PDB: 3IUT, <http://www.rcsb.org>).

O sítio ativo foi definido como todos os átomos que estão dentro do raio de 6,0 Å a partir do ligante co-cristalizado (KB2). O programa GOLD 5.2 (Cambridge Crystallographic Data Centre, UK) foi utilizado para realizar os cálculos de *docking* molecular, utilizando a função de pontuação ChemPLP.

Para levar em consideração os graus de liberdade do receptor, com o intuito de simular melhor o ajuste induzido, os seguintes aminoácidos tiveram seus grupos laterais tratados como flexíveis, utilizando a biblioteca de confórmeros: CYS25, TRP26, ASP60, SER64, LEU67, MET68, ASN70, MET160, ASP161 e LYS162.

Posteriormente, o programa BINANA (Durrant e Mccammon, 2011) foi utilizado para analisar as interações intermoleculares das soluções de docking, utilizando-se os parâmetros padrão. As figuras foram geradas utilizando-se o programa Pymol (Delano, 2002).

5.3 Animais

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

5.4 Obtenção de esplenócitos murinos

Após sacrifício do animal em câmara de CO₂, removeu-se o baço de cada camundongo em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) +1% de antibiótico. No fluxo vertical, transferiu-se cada baço para placa de Petri onde foram macerados utilizando a parte fosca de lâminas de microscopia.

As suspensões celulares foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10ml de meio RPMI+1% de antibiótico por baço, centrifugadas 400

x g durante cinco minutos. O sedimento (contendo as células) foi ressuspenso em meio RPMI+1% de antibiótico+10% de soro fetal bovino (SFB). Uma alíquota da suspensão celular foi corada com azul de *trypan* para ser quantificada e verificada a viabilidade celular em câmara de Neubauer.

5.5 Avaliação da atividade citotóxica

5.5.1 Células de linhagem macrofágica RAW 264.7

Macrófagos da linhagem RAW 264.7 (10^5 células/ml) foram semeados em placas de 96 poços (198 µl em cada poço) contendo meio DMEM completo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C *overnight*. Posteriormente, foram adicionados os compostos em diferentes concentrações (100; 50; 25; 10; 5; 1 µg/ml), sendo novamente incubados pelas mesmas condições durante 48h (Pereira *et al.*, 1994). Cada composto foi testado em duplicata.

Após esse período, foi adicionado MTT brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-bifenil tetrazolium) em PBS(5 mg/mL, p/v), seguido de nova incubação por 2h a 37°C. O meio de cultura, juntamente com o excesso de MTT será aspirado e 100µL de DMSO será adicionado para dissolução dos cristais de formazan (Alley *et al.*, 1998). A densidade óptica será lida em leitor de placas de 595 nm.

O controle negativo da reação foi obtido em poços contendo apenas meio de cultura e células (sem tratamento). Também foi avaliada a atividade da droga de referência benzonidazol. A média da densidade óptica (OD) dos poços testes será comparada com a média da densidade óptica do grupo controle para determinação da CC₅₀

5.6 Avaliação da atividade tripanocida

5.6.1 Epimastigotas

Para determinar o efeito antiproliferativo para formas epimastigotas da cepa DM28c (106 parasitos/ml), mantidas em meio LIT+1% de antibiótico+20% de SFB,

foram semeadas em placas de 96 poços a 27 °C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/ml) por 96h.

Testou-se cada composto em duplicata. O controle negativo da reação foi poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benzonidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de Neubauer e, a partir desses valores, obteve-se a IC50 (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitos).

5.6.2 Tripomastigotas

As formas tripomastigotas (cepa Y) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* (107 parasitos) da linhagem de células Vero, após estas obterem confluência em cultura. Para determinar o efeito antiproliferativo para formas tripomastigotas da cepa Y (4x10⁶ parasitos/ml), mantidas em meio RPMI+1% de antibiótico+5% de SFB, foram semeadas em placas de 96 poços a 37°C, juntamente com diferentes concentrações dos compostos (0,19; 1,56; 6,25; 25; 100 µg/ml) por 24h a atmosfera de 5% de CO₂.

Testou-se cada composto em duplicata. Obteve-se como controle negativo da reação poços sem tratamento e a droga de referência utilizada como controle positivo foi o benzonidazol. Determinou-se a viabilidade parasitária por contagem direta em câmara de Neubauer e, a partir desses valores, obteve-se a IC50.

5.6.3 Amastigotas

As formas tripomastigotas (cepa Tulahuen) foram obtidas a partir da infecção *in vitro* da linhagem de células L929, após estas obterem confluência em cultura. Para a obtenção de formas amastigotas, células L929 foram semeadas em placas de 96 poços, fundo reto e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Parasitas foram adicionados na proporção de 10 tripomastigotas/L929.

Após 3h de interação, os parasitas não internalizados foram removidos, e as placas incubadas por 48h para a consolidação da infecção. Os compostos foram adicionados em diferentes concentrações (0,6 a 20 µg/mL), e as placas incubadas novamente por 96h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo e poços com Benzonidazol como controle positivo.

Ao final da incubação foi adicionada a solução de CPRG (Chlorophenol red- β -D-galactopyranoside, 500 μ M, 0,5% de Nonidet P-40, em PBS), seguida de nova incubação por 18h, a a 37°C. Foi realizada a leitura da absorbância a 570 nm no espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. Os valores de IC₅₀ foram calculados por análise de regressão utilizando o software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

5.7 Análise estatística

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

5.8 Produção de linha transgênica de *T. cruzi* expressando o gene repórter da luciferase

5.8.1 Amplificação do gene da luciferase, clonagem e subclonagem

Para a subclonagem do gene da luciferase no plasmídeo pROCK, gentilmente cedido pela Dr^a Amaranta Muniz Malvezzi, foi necessário realizar uma troca de base de nitrogenada que não alterasse a proteína da luciferase. Foi realizado a técnica de PCR em duas etapas. Na primeira etapa é amplificado o início do gene até onde será inserido a mutação, modificando o primer *reverse* com a mutação desejada.

Numa segunda PCR é realizada a amplificação do gene completo utilizando o produto da primeira PCR como um megaprimer iniciador com o primer reverso comum do fim do gene. É gerado assim o gene completo com uma mutação pontual no local desejado. Para amplificação do gene a partir do plasmídeo pLEW foram desenhados primers (forward 5'- CTCGAGTTACAATTTGGACTTTCC- 3') (reverse com mutação – 5'- CCATCCTCAAGAGGATAG- 3') e (reverse comum- 5'-

TCTAGAGGCGGCAATGGAAGACGCC- 3') com restrição para as enzimas *XbaI* e *XhoI* (Thermo Fisher Scientific).

Foram utilizadas as enzimas Pfx 50 (Thermo Fisher Scientific) e GoTaq (Promega) na primeira e segunda etapa da PCR, respectivamente. Todas as eletroforeses foram realizadas em gel de agarose 1% corado com SYBR Green (Thermo Fisher) e analisadas em fotodocumentados L-PIX (Loccus).

As condições da reação de PCR foram 94 °C por 3 minutos para desnaturação inicial, seguida de 35 ciclos (94°C – 30s/ 65 °C – 55°C – 1m/ 68 °C 30s) e 3 min 68°C para extensão final. O fragmento amplificado, foi purificado e clonado no vetor de clonagem pGEM- T Easy (Promega) e transformado em células de E.coli quimiocompetentes por choque térmico, sendo as colônias selecionadas em meio LB-AMP(50ug/mL) contendo IPTG (1 uL a 100mM) e X-Gal (1 uL a 20mg/mL).

O DNA plasmidial das colônias brancas foram extraídos através da lise alcalina e confirmados através de digestão com a enzima EcoRI (Thermo Scientific) a 37° C por 2 horas em banho-maria. As amostras que liberaram uma banda no tamanho predito na digestão foram submetidas ao sequenciamento, realizado no equipamento ABI Prism 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) do Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do CPqAM-FIOCRUZ.

As sequências obtidas a partir dos eletroferogramas gerados nas reações de sequenciamento foram analisadas no programa *EditSeq v 5.0* (DNASar-Lasergene). Em seguida estas foram submetidas a uma busca realizada pelo BLAST (Altschul, *et al* 1990), para identificação do gene da luciferase.

Para as subclonagens, a construção plasmidial no vetor pGEMT-easy contendo o gene da luciferase foi digerido com enzimas de restrição *XbaI*/*XhoI* (Thermo Fisher Scientific), para obtenção dos fragmentos de DNA esperado. As bandas de interesse foram excisadas e purificadas utilizando-se o sistema de purificação GFX (GE Healthcare®) conforme recomendação do fabricante.

O vetor plasmidial pROCK (figura 10) continha o gene da GFP, o qual foi liberado através da digestão com as enzimas de restrição *XbaI*/*XhoI* (Thermo Fisher Scientific), sendo posteriormente purificado com o sistema de purificação GFX (GE Healthcare®) conforme recomendação do fabricante.

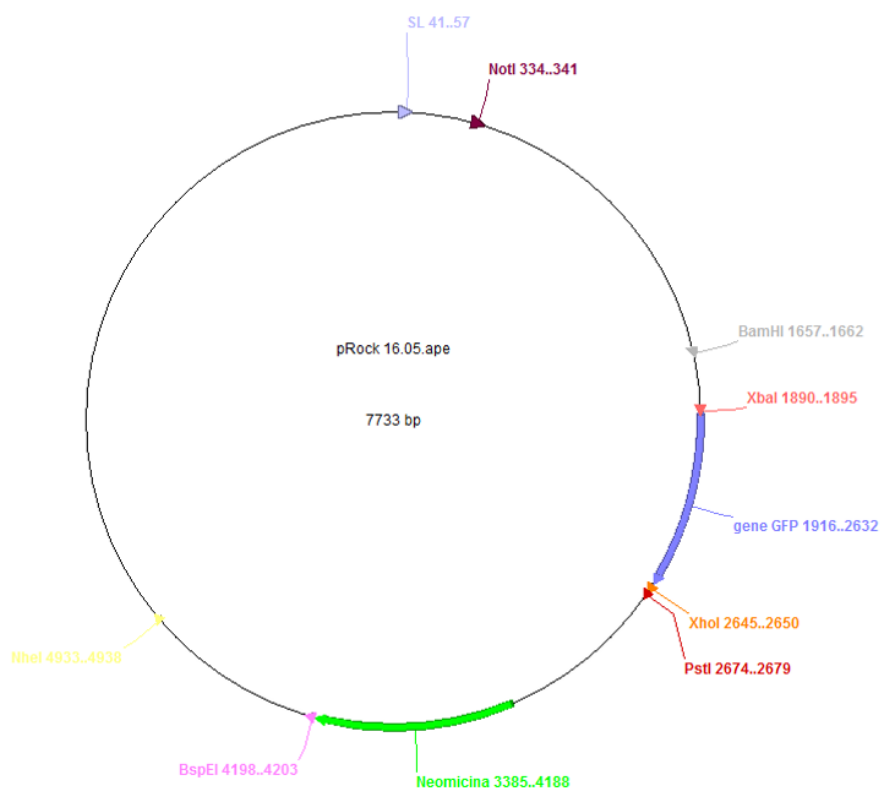
A construção do plasmídeo recombinante através da ligação do plasmídeo digerido e fragmento purificado com a enzima T4 DNA ligase 0.4 U (*NEW ENGLAND Biolabsinc.*), juntamente 1 µl de tampão10x (Ligase Buffer), 100 ng do vetor linearizado e água Milli-Q em quantidade suficiente para o volume final de 10 µl a 16°C por 18 horas. Reações contendo o vetor com o gene GFP e reações o com o vetor linearizado, foram utilizados como controles negativos da ligação.

As construções foram transformadas em bactérias *E. coli* cepa TOP10 competentes, através de choque térmico (30 minutos imersas em gelo e 5 minutos em banho-maria à 37°C) em solução tamponada de cloreto de magnésio. Em seguida, estas células, foram plaqueadas em meio LB sólido contendo ampicilina na concentração de 100 µg/mL, crescendo durante 16 horas em estufa a 37°C.

Após análise das placas, colônias de cada gene foram escolhidas aleatoriamente, isoladas e inoculadas em tubos contendo 3 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µg/mL). Os inóculos foram então colocados sob agitação constante em temperatura de 37°C por aproximadamente 16 horas.

Após o crescimento, foram retiradas alíquotas de 1,5 mL dos inóculos, para obtenção de um sedimento através de centrifugação à 12.000 g por 3 minutos. A partir do sedimento foi realizado o protocolo da extração de DNA plasmidial (minipreparação) manual, e a análise do plasmídeo obtido realizada em gel de agarose a 1% corado com SYBR Green (Thermo Fisher).

Figura 10 – Mapa do vetor de expressão em *T. cruzi*. pROCK-GFP-Neo



Fonte: A autora, 2019.

A enzima de modificação Antarctic Phosphatase (*NEW ENGLAND Biolabs*), possui a função de desfosforilar a extremidade 5' do DNA e sua utilização foi necessária para minimizar os eventos de religação de DNA plasmidial nas etapas de subclonagem, eventos estes induzidos pela presença de fragmentos resultantes de apenas uma das duas enzimas, *XbaI*/*XhoI*, utilizadas nas reações de subclonagem. Para fins de utilização dessa enzima foi seguida às instruções do fabricante.

A escolha desta enzima (Antarctic Phosphatase) de modificação em relação a fosfatase alcalina tradicional (Calf Intestinal Phosphatase - CIP) se deu pelo fato da primeira possuir temperatura de inativação, facilitando assim seu uso e possibilitando um maior controle da reação. A confirmação das subclonagens foi feita através da análise pela digestão (usando as enzimas *BamHI* e *XhoI*) e corrida em gel de agarose 1%.

6 RESULTADOS

6.1 Síntese e caracterização química

Uma vez realizado o planejamento estrutural, procedeu-se à síntese dos compostos propostos. A figura 11 apresenta a sequência de reações envolvidas na síntese dos novos tiazóis. Os compostos 2-17 foram sintetizados via condensação com base de Schiff, em uma simples reação química de 2 etapas. Primeiramente, as tiossemicarbazonas (1a-b) foram preparadas pela reação de 2,3,4-tricloroacetofenona ou 3,4-dicloroacetofenona comercialmente disponíveis com tiossemicarbazida em banho de ultrassom na presença de H_2SO_4 catalítico.

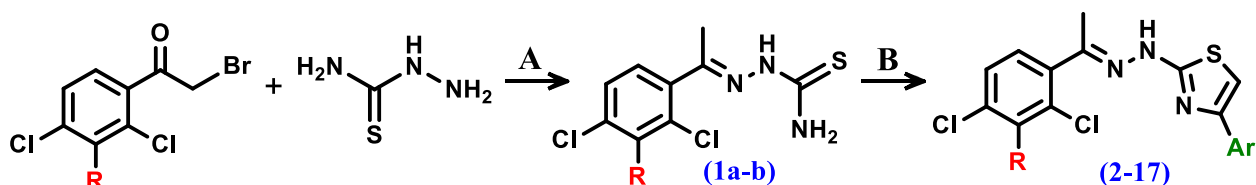
Os tiazóis (2-17) foram preparados de acordo com a metodologia descrita por Hantzsch, pela reação da respectiva aril tiossemicarbazona com α -haloacetofenonas comercialmente disponíveis (Figura). Essas reações foram realizadas na presença de um excesso de NaOAc anidro sob refluxo, proporcionando compostos com rendimentos variáveis (22-75%) e pureza aceitável (>95%).

As estruturas químicas dos compostos foram determinadas por ressonância magnética nuclear (RMN, ^1H and ^{13}C) e infravermelho (IV). A análise dos espectros de RMN de ^1H and ^{13}C dos compostos (2-17) destacou os sinais relativos à metina localizada na posição C-5 do anel heterocíclico, que são diagnósticos para esta classe de compostos.

Em RMN ^{13}C , o carbono metino C4 representativo do anel tiazol está localizado aproximadamente em $\delta = 105$ ppm. Em IV, a presença da banda referente às ligações imínicas, bem como a ausência de absorção na região carbonilada, também são sugestivas da formação de compostos (2-17).

Outra característica estrutural importante desses compostos é a posição da ligação dupla envolvendo o carbono C2 do anel heterocíclico. Na RMN ^1H dos compostos (2-17), o deslocamento químico do N-H apresenta uma mediana de 4,87 ppm ($\text{DMSO}-d_6$).

Figura 11- Síntese dos compostos propostos



Cpd.	R	Ar	Cpd.	R	Ar	Cpd.	R	Ar
1a	Cl	---	6	Cl	4-NO ₂ -Ph	12	Cl	3-NO ₂ -Ph
1b	H	---	7	Cl	3,4-Cl-Ph	13	H	Ph
2	Cl	Ph	8	Cl	4-Ph-Ph	14	H	4-Cl-Ph
3	Cl	4-F-Ph	9	Cl	2-Naph	15	H	4-OMe-Ph
4	Cl	4-Cl-Ph	10	Cl	2,4-Cl-Ph	16	H	4-NO ₂ -Ph
5	Cl	4-OMe-Ph	11	Cl	4-Br-Ph	17	H	4-Ph-Ph

Fonte: A autora, 2022.

Legenda: Síntese dos compostos. (A) Obtenção de **1a** e **1b** (Reagentes e condições): respectivamente chloroacetonas, tiossemicarbazidas, etanol, H_2SO_4), 2hrs; (B) Obtenção de 1,3-tiazóis **2-17** (Reagentes e condições): **1a** ou **1b**, respectivamente halo acetofenonas, isopropanol, refluxo a 100 °C, com agitação por 2-6h.

6.2 Avaliação farmacológica

Após a caracterização estrutural dos 1,3 tiazóis, foi determinada a ação antiparasitária e a citotoxicidade na célula hospedeira. Inicialmente, os compostos foram avaliados quanto à sua capacidade de inibir a proliferação de epimastigotas da cepa Dm28 de *T.cruzi*, bem como sua toxicidade contra tripomastigotas da cepa Y. Em seguida, a citotoxicidade foi determinada em macrófagos RAW 264.7 e os resultados foram expressos em uM.

Os resultados foram expressos respectivamente em termos de valores de IC₅₀ e CC₅₀. O medicamento de referência utilizado foi o benzonidazol (BZD), que apresentou valor CC₅₀ 40,96 uM contra tripomastigotas. Os compostos que exibiram CC₅₀ inferior ao de BDZ neste ensaio foram considerados agentes ativos anti *T.cruzi*.

Na tabela 2, em relação à atividade antiproliferativa contra a forma epimastigota, todos os compostos foram mais ativos que o benzonidazol e capazes de inibir a **proliferação** de epimastigotas, que apresentou IC₅₀ menor que o BZD. Em relação à atividade dos compostos contra a forma tripomastigota, os valores de IC₅₀ revelaram que os compostos 8 (2,64µM), 4 (3,27µM), 10 (4,08 µM) e 16 (4,82µM) foram pelo menos 10 vezes mais potente que o BDZ. Os compostos 2, 14 e 17 foram

duas vezes mais ativos, enquanto os compostos 3,5,7,13 e 15 foram tão equipotentes quanto o BDZ. O compost 9 estava inativo (65,96 μM).

Em relação à atividade tripanocida contra a forma amastigota, o composto 15 apresentou o melhor valor de IC_{50} (3,65 μM), sendo mais ativo que o fármaco padrão BDZ (5,64 μM). Os compostos 11 (5,96 μM) e 12 (4,46 μM) exibiram atividade equipotente quando comparados ao BDZ.

Sobre a citotoxicidade em macrófagos, alguns dos tiazóis apresentaram baixa citotoxicidade. Por exemplo, os compostos 6,8,9,14,16 e 17 apresentaram $\text{CC}_{50} > 44,18\mu\text{M}$.

Tabela 2- Citotoxicidade dos compostos DGM em linhagem celular de macrófago RAW 264.7 e atividade tripanocida contra as formas epimastigota, tripomastigota e amastigote de *T. cruzi*.

Compostos DGM	R ₁	R ₂	Citotoxicidade (RAW 264.7) CC_{50} μM^a	IC_{50} Epimastigota μM	IC_{50} Tripomastigota μM (cepa Y)	IC_{50} Amastigota μM	Índice de Seletividade ^b Amastigota
2	Cl	Ph	30.19	13.84	11.54	20.58	2.61
3	Cl	4-F-Ph	42.22	19.44	21.48	27.9	1.96
4	Cl	4-Cl-Ph	39.65	10.63	3.27	8.71	12.12
5	Cl	4-MeO-Ph	27.08	7.88	30.86	7.84	
6	Cl	4-NO ₂ -Ph	88.49	28.95	ND	45.27	-
7	Cl	3,4-diCl-Ph	44.90	32.15	25.45	25.45	3.47
8	Cl	4-Ph-Ph	62.24	8.62	2.64	12.88	23.65
9	Cl	2-Naphtyl	96.24	10.86	65.96	25.38	1.45
10	Cl	2,4-diCl-Ph	36.29	8.33	4.08	13.57	8.89
11	Cl	4-Br-Ph	29.85	5.25	ND	5.96	-
12	Cl	3- NO ₂ -Ph	29.22	8.42	ND	4.46	-
13	H	Ph	42.81	7.42	45.93	21.34	NR
14	H	4-Cl-Ph	55.12	7.55	17.9	10.57	3.13
15	H	4-MeO-Ph	43.15	3.48	45.29	3.65	NR
16	H	3,4-diCl-Ph	97.3	6.41	4.82	28.26	20.27
17	H	4-Ph-Ph	80.12	20.2	10.56	14.88	7.58
BDZ	-	-	44.18	56.94	40.96	5.64	4.03

Fonte: Elaborado pela autora (2022).

Legenda: NS não seletivo

6.3 Parâmetros ADME e físico-químicos

A notação SMILES para todas as moléculas aqui investigadas foi submetida ao servidor online SwissADME (swissadme.ch) para determinar os descritores físico-químicos, as propriedades farmacocinéticas e a *druglikeness* de todos os compostos.

De acordo com a regra dos cinco de Lipinski, compostos semelhantes a drogas a serem administrados oralmente não devem ter mais de uma violação. Um composto que obedece a pelo menos três dos quatro critérios pode aderir à regra de Lipinski. A predição para todas as moléculas também mostra concordância com a regra de Veber e colaboradores, 2002.

Um resumo dos parâmetros previstos como: peso molecular, LogP, biodisponibilidade oral, área de superfície polar (TPSA), doadores e aceptores de ligações de hidrogênio, são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3- Propriedades físico-químicas dos compostos DGM (2-17), calculado por Swiss ADMW.

Cpd.	Cpd. 2	Cpd. 3	Cpd. 4	Cpd. 5	Cpd. 6	Cpd. 7	Cpd. 8	Cpd. 9	Cpd. 10	Cpd. 11	Cpd. 12	Cpd. 13	Cpd. 14	Cpd. 15	Cpd. 16	Cpd. 17	BDZ
MW	396.72	414.71	431.17	426.75	441.72	465.61	472.82	446.78	465.61	475.62	441.72	362.28	396.72	392.30	407.27	438.37	260.25
#Rotatable bonds	4	4	4	5	5	4	5	4	4	4	5	4	4	5	5	5	6
#H-bond acceptors	2	3	2	3	4	2	2	2	2	2	4	2	2	3	4	2	4
#H-bond donors	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
MR	104.86	104.82	109.87	111.36	113.69	114.88	130.30	122.37	114.88	112.56	113.69	99.85	104.86	106.35	108.68	125.29	69.41
TPSA	65.52	65.52	65.52	74.75	111.34	65.52	65.52	65.52	65.52	65.52	111.34	65.52	65.52	74.75	111.34	65.52	92.74
ESOL Log S	-6.76	-6.92	-7.35	-6.82	-6.81	-7.94	-8.24	-7.89	-7.94	-7.66	-6.81	-6.17	-6.76	-6.23	-6.22	-7.65	-2.06
GI absorption	High	Low	Low	High	Low	Low	Low	Low	Low	Low	Low	High	High	High	Low	Low	High
BBB permeant	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
Pgp substrate	No	No	No	No	No	No	Yes	Yes	No	No	No	No	No	No	No	Yes	No
CYP1A2 inhibitor	Yes	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
CYP2C19 inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No
CYP2C9 inhibitor	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No
CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No
CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No	Yes	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	No
Lipinski #violations	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0
Ghose #violations	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
Veber #violations	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Egan #violations	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
Muegge #violations	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
AlogP	6.61	6.75	7.26	6.62	6.51	7.91	8.27	7.76	7.91	7.37	6.51	5.95	6.61	5.96	0.7143	7.62	1.11
Human oral bioavailability	0.6571	0.6857	0.6429	0.5429	0.8	0.5714	0.6286	0.7714	0.6857	0.6286	0.7429	0.6143	0.6	0.5286	5.86	0.6	0.7286

Fonte: O autor

6.4 Docking molecular

Ao observar os valores de *score* (ChemPLP) das soluções de *docking* dos compostos DGM (tabela 3) observa-se que não ocorreram grandes variações de afinidade predita entre os isômeros (E e Z) de cada composto, apresentando uma

variação média de 1,12 pontos de ChemPLP. A diferença de *score* variou entre 51,48 (DGM-E- 4) e 67,63 (DGM-Z-8), variação de 16.15. Como os isômeros Z costumam ter maior afinidade pela cruzaína, em comparação com o isômero E, para cada molécula, apenas eles (Z) foram considerados.

Tabela 4 - Valores de *score* (ChemPLP) para as soluções de docking dos compostos DGM em seus respectivos isômeros E e Z.

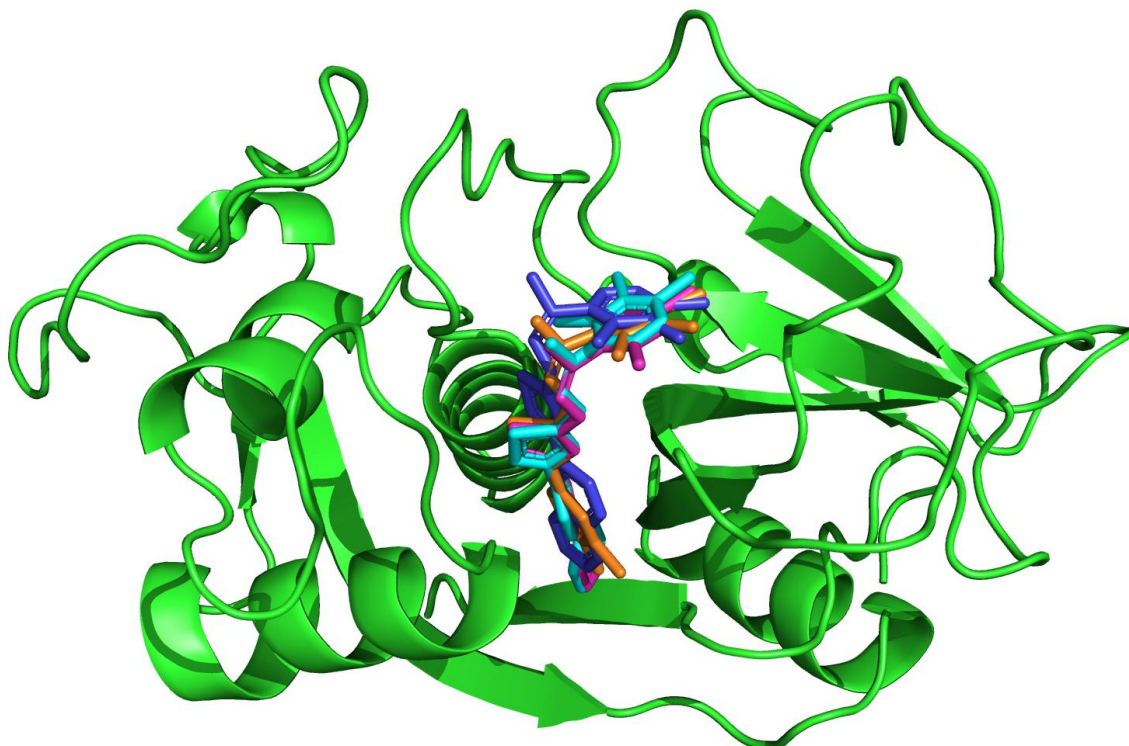
Composto	E	Z	Z-E	Composto	E	Z	Z-E
2	53,31	53,5	0,19	12	54,41	55,54	1,13
3	54,54	54,54	0,76				
4	51,48	57,73	6,25	13	54,21	54,82	-2,22
5	56,08	58,15	2,07	14	54,93	55,2	0,27
6	54,4	52,74	-1,66	15	57,75	54,82	-2,93
7	53,79	59,18	5,39	16	56,59	54,51	-2,08
8	64,82	67,63	2,81	17	60,82	67,44	6,62
9	58,34	58,96	0,62				
10	58,76	58,33	-0,43				
11	52,73	54,52	1,79				

Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Os isômeros dos compostos DGM-7, DGM-8, DGM-9, DGM-10 e DGM-17 estão entre os 9 melhores compostos em termos de afinidade predita, sendo que para o composto DGM-7 apenas o isômero Z apresentou um bom resultado (figura 12). Ao analisar as estruturas dos compostos DGM, observou-se que a única diferença estrutural entre os dois compostos que apresentaram a melhor afinidade predita pela cruzaína (DGM-8: 67,63/DGM-17: 67,44) está na presença de um átomo de cloro como substituinte na posição 2 de um dos anéis aromáticos no composto DGM-17.

Além disto, estes dois ligantes diferem em relação aos demais compostos desta série pela utilização de um grupo fenil como substituinte em um dos anéis aromáticos. Ademais, o composto DGM-9, o qual possui um naftil substituindo um dos anéis aromáticos, também apresentou uma boa afinidade predita, apresentando um efeito similar ao observado na adição do fenil realizada pelos compostos DGM-8 e DGM-17.

Figura 12- Interação entre os compostos da série DGM e a cruzaina



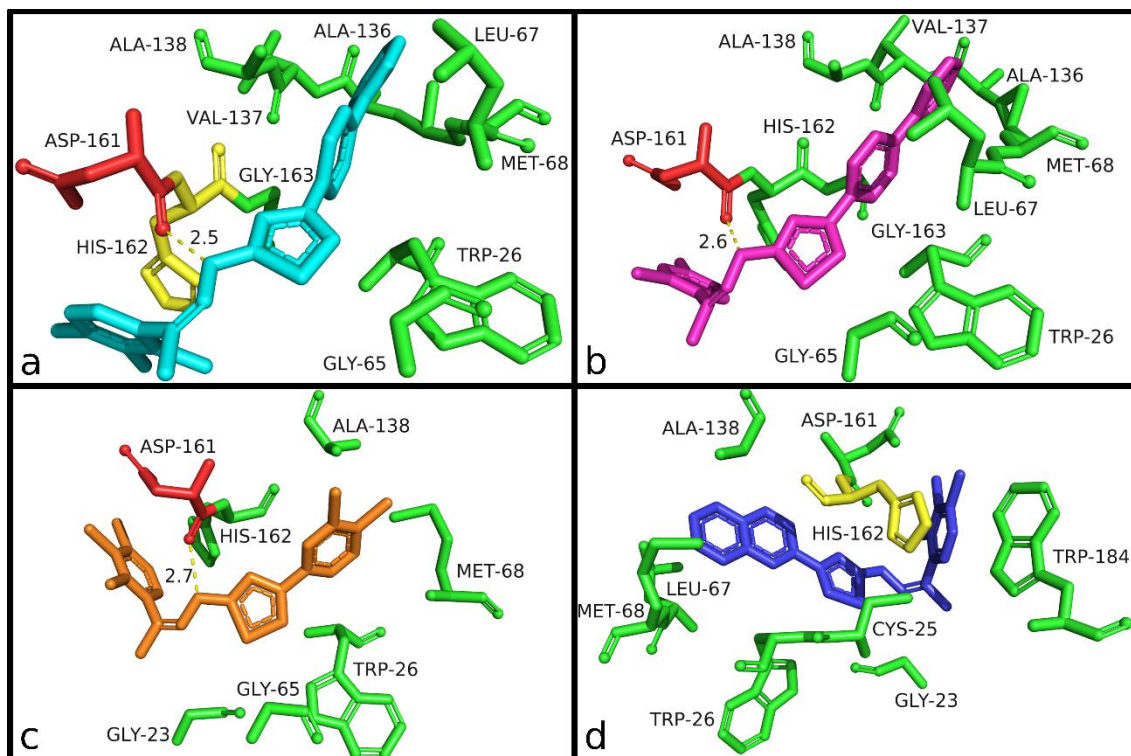
Fonte: Elaborado pela autora, 2022.

Legenda: As melhores soluções de *docking* para os quatro melhores compostos (DGM-8, DGM-17, DGM-7 e DGM-9), em termos de afinidade predita, posicionados no sítio ativo da cruzaina.

Em relação aos compostos DGM-7 e DGM-10 diferem estruturalmente no posicionamento de átomos de cloro em um dos anéis aromáticos. Enquanto o composto DGM-7 possui átomos de cloro posicionados nas posições 2 e 3 do anel aromático, o composto DGM-10 possui estes mesmos átomos de cloro nas posições 1 e 3 do anel aromático.

O composto DGM-8 (Figura 13a) realizou uma ligação de hidrogênio com o resíduo ASP161 e contatos hidrofóbicos com os resíduos TRP26, GLY65, LEU67, MET68, ALA136, VAL137, ALA138 e GLY163. Já o composto DGM-17 (Figura 13b) realizou uma ligação de hidrogênio com o resíduo ASP161 e contatos hidrofóbicos com os resíduos TRP26, GLY65, LEU67, MET68, ALA136, VAL137, ALA138, HIS162 e GLY163. Vale ressaltar que os compostos DGM-8 e DGM-17 realizaram interações com os mesmos resíduos, diferindo apenas no tipo de interação ocorrida com o resíduo HIS162, o qual realizou um *pi-pi stacking* com o composto DGM-8 e apenas um contato hidrofóbico com o composto DGM-17.

Figura 13- As interações intermoleculares que ocorrem nas melhores soluções de docking dos compostos da série DGM e os resíduos de aminoácidos do sítio ativo da cruzaina.



Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Legenda: (a) DGM-1.7 (ciano), (b) DGM-2.7 (magenta), (c) DGM-1.6 (laranja) e (d) DGM-1.9 (azul). As ligações de hidrogênio estão na cor vermelha, *pi-pi* stackings estão na cor amarela e contatos hidrofóbicos estão na cor verde.

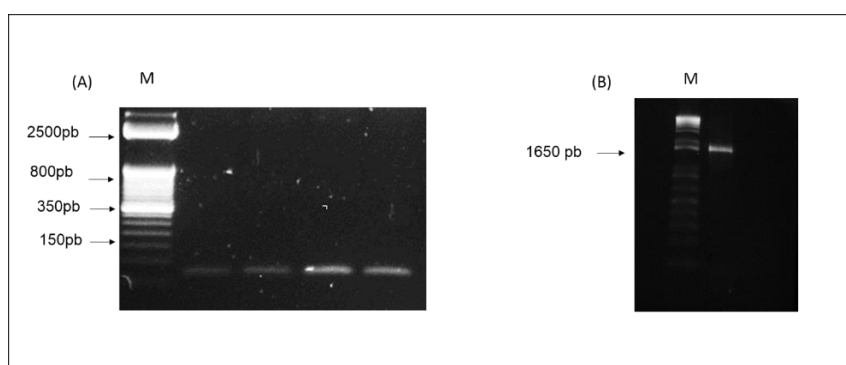
O composto DGM-7 (Figura 13c) realizou uma ligação de hidrogênio com o resíduo ASP161 e contatos hidrofóbicos com os resíduos CYS23, TRP26, GLY65, MET68, ALA138 e HIS162. Enquanto o composto DGM-9 (Figura 13d) realizou um *pi-pi* stacking com o resíduo HIS162 e contatos hidrofóbicos com os resíduos GLY23, CYS25, TRP26, LEU67, MET68, ALA138, ASP161 e TRP184.

Além disto, alguns resíduos de aminoácidos presentes no sítio ativo da cruzaina se mostraram importantes para estabilização dos compostos DGM, sendo eles: a) ASP161, o qual realizou uma ligação de hidrogênio com 14 isômeros diferentes; b) TRP26 e HIS162, os quais realizaram 3 e 2 *pi-pi* stackings, respectivamente, além de realizarem contatos hidrofóbicos com a maioria dos isômeros; c) GLY23, GLY65, LEU67, MET68 e ALA138, os quais realizaram contatos hidrofóbicos com a maioria dos isômeros; d) LEU160 e GLU208, os quais realizaram contatos hidrofóbicos com a maioria dos isômeros E; e) TRP184, que realizou contatos hidrofóbicos com a maioria dos isômeros Z.

6.5 Amplificação e clonagem no vetor *pGEMT-easy*

Na figura 14 estar representada em gel de agarose 1% as bandas referentes à amplificação obtida pelo esquema de *megaprimer* na primeira etapa da PCR e a amplificação completa do gene da luciferase no tamanho predito. Para as amplificações até a região da mutação, as bandas se encontram em $\approx 60\text{pb}$ (figura A). Já para o gene completo a amplificação é de $\approx 1650\text{pb}$ (figura B).

Figura 14- Amplificação do gene da luciferase em duas etapas.



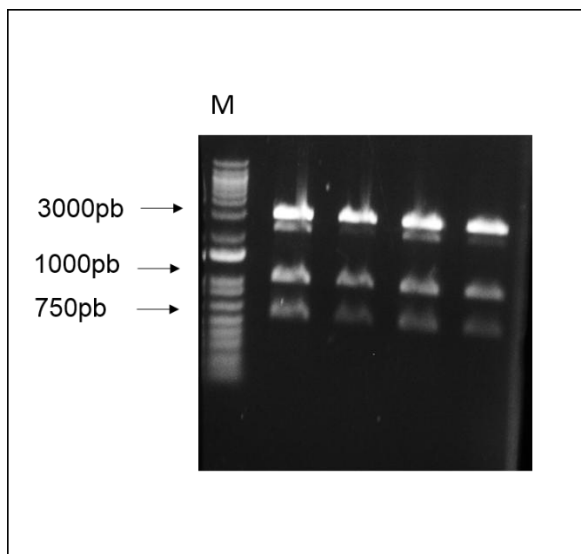
Fonte: A autora, 2022.

Nota: PCR dos esquemas do esquema de *megaprimer* demonstrando bandas de aproximadamente $\approx 60\text{pb}$ em (A) e em (B) amplificação completa do gene da luciferase, demonstrando banda de aproximadamente $\approx 1650\text{pb}$. Marcador (M): 1 Kb plus (Invitrogen).

6.5.1 Clonagem em *pGEM T- easy*

Na figura 15 observa-se uma digestão de confirmação da clonagem com a enzima de restrição *EcoRI*, para a verificação da inserção do gene da luciferase amplificado no vetor de clonagem *pGEM T-easy*. O gel apresenta o plasmídeo no tamanho aproximado de $\approx 3000\text{pb}$. O gene da luciferase possui um sítio de *EcoRI* dentro dele por isso o aparecimento de duas bandas, $\approx 1000\text{pb}$ e $\approx 750\text{pb}$, respectivamente.

Figura 15 - Digestão das clonagens do gene da luciferase.



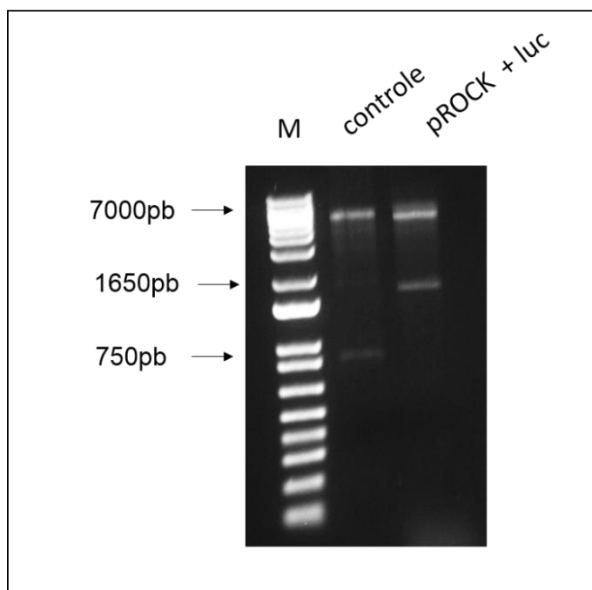
Fonte: A autora, 2022.

Nota: Digestão em gel de agarose 1%, com a enzima EcoRI, demonstrando o inserto no tamanho esperado de 1000pb e 750pb. Marcador (M): 1 Kb plus (Invitrogen).

6.6 Subclonagem no vetor de expressão

O gene repórter da luciferase obtido através da clonagem em pGEMT-easy foi purificado e confirmado através de sequenciamento. Para obtenção da linhagem repórter de *T.cruzi* foi necessária à subclonagem do gene da luciferase no vetor de expressão pROCK. Para essa subclonagem, o plasmídeo pROCK foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e XhoI, assim como o gene da luciferase. Na figura 16 observa-se o controle, plasmídeo pROCK liberando um gene de tamanho diferente da luciferase, $\approx 7000\text{pb}$ e $\approx 750\text{pb}$, respectivamente. E o plasmídeo pROCK $\approx 7000\text{pb}$, liberando o gene da luciferase no tamanho predito $\approx 1650\text{pb}$.

Figura 16- Confirmação de subclonagem do gene da luciferase no pROCK



Fonte: A autora, 2022.

Nota: Gel de agarose após a eletroforese dos fragmentos de DNA resultantes da reação de subclonagem. Digestão enzimática das minipreparações com as enzimas *Xba*H e *Xho*I verificando a liberação do fragmento no tamanho esperado de 1650 pb para os genes luciferase e 7000 pb para o vetor plasmidial pROCK. Como controle utilizou-se o plasmídeo pROCK com as mesmas enzimas da reação anterior, liberando um fragmento de tamanho diferente do gene da luciferase, de 750pb. O tamanho dos fragmentos do marcador de peso molecular está mostrados a esquerda.

7 DISCUSSÃO

Neste trabalho a atividade antiparasitária e citotóxica dos compostos da série 1,3-tiazóis substituídos foram avaliados. Também iniciamos a construção de uma cepa transgênica fluorescente. Os compostos foram desenhados tendo como alvo uma cisteíno-protease de *T. cruzi*, a cruzaina, a qual é um alvo validado para os estudos de novos compostos para a doença de Chagas (ÁLVAREZ; NIEMIROWICZ; CAZZULO, 2012; CAZZULO, 2002). O fato de ser uma enzima lisossomal, uma forma de inibi-la é interrompendo sua produção e transporte (APT, 2010). O principal modo de ação dos compostos que inibem as cisteíno-proteases é pela interrupção da produção das enzimas e do transporte delas para lisossomos, pois elas são enzimas lisossomais (APT, 2010).

Nesta série, os tiazóis foram obtidos a partir de dois diferentes derivados de tiossemicarbazonas: a 2',3',4'-tricloraacetofenona (2-12) e a 2,2',4'-tricloraacetofenona (13-17). Não foi possível estabelecer uma tendência quanto à influência da substituição do cloro no anel fenil, uma vez que os compostos de ambas as sub-séries foram altamente ativos contra as formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi*.

Também não há tendência quanto à substituição em C4 do anel tiazol. No entanto, observou-se que o grupo naftila é deletério para a atividade tripanocida, uma vez que o composto 9 foi inativo para as formas tripomastigota (IC₅₀ 65,96 µM) e amastigota (25,38 µM). Podemos destacar os compostos 4, 8, 10 e 16 por sua interessante atividade contra as formas tripomastigotas do parasito.

Todos os compostos testados por esse ensaio mostraram algum grau de atividade citotóxica. No entanto os compostos 4, 8 e 16 mostraram um bom índice de seletividade para as formas amastigotas e tripomastigotas, sendo compostos considerados promissores.

Observou-se que os compostos que possuem um anel aromático como substituinte, seja através da adição de um fenil (DGM-8 e DGM-17), quanto através da modificação de um dos grupos fenil por um naftil (DGM-9), obtiveram soluções de *docking* mais estáveis quando comparados com compostos que não possuem este anel adicional. Isto ocorre porque ao aumentar o número de átomos de carbono presentes nos compostos ligantes, aumenta-se também a possibilidade de realização de contatos hidrofóbicos com um número maior de resíduos.

Além disto, por tratar-se de anéis aromáticos, aumenta-se também as chances de realização de interações do tipo *pi-pi stackings*. Vale ressaltar que três dos cinco *pi-pi stackings* observados ocorreram com isômeros destes compostos que, embora não tenham ocorrido com o anel aromático adicional, pode ter sido possível devida a estabilidade estrutural destes compostos no sítio ativo da macromolécula.

Além disso, observou-se que a adição de átomos de cloro como substituintes também aumentou a afinidade destes compostos pela cruzaina. Os compostos DGM-7 e DGM-10 possuem cinco átomos de cloro, os quais estão distribuídos entre os dois anéis aromáticos, dois em um dos anéis e três no outro, também apresentaram boas soluções de *docking* (DGM-7: 59,18 e DGM-10: 58,76).

Assim, acredita-se que a utilização de anéis aromáticos e/ou átomos de cloro como substituintes na série de moléculas DGM podem ser o motivo por trás do aumento da afinidade destes compostos pelo sítio ativo da enzima cruzaina, quando comparados com as demais moléculas desta série, que não possuem estas substituições, potencializando as chances desses compostos como possíveis candidatos à fármacos anti-*T. cruzi*, inibidores da enzima cruzaina.

No processo de descoberta e design de medicamentos, espera-se que moléculas promissoras apresentem alta atividade biológica, com baixa toxicidade e propriedades ADME ideais, sendo assim parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos são extremamente importantes (PELLEGATI, 2012).

Os parâmetros ADME podem ser estimados através de abordagens *in silico*, usando sua estrutura molecular para previsões (ALQAHTANI, 2017). Conforme demonstrado no presente trabalho, os compostos mais ativos (4, 8, 10 e 16) mostraram concordância com a regra de Lipinski, e possuem similaridade farmacológica quando comparados ao BDZ.

O *druglikeness* compara as propriedades de moléculas (candidatos à fármacos) em desenvolvimento com fármacos já aprovados (MIGNANI et al., 2018). As regras que indicam que um composto é um bom *druglikeness* são as regras de Lipinski, Ghose, Veber, Egan e Muegge.

Os compostos mais ativos (4, 8, 10 e 16) apresentaram concordância com a regra de Lipinski, similares com o BZD, porém com baixa permeabilidade com base na absorção gastrointestinal (GI), e não são permeáveis à barreira hematoencefálica (BHE). Como a Doença de Chagas não tem implicação no sistema nervoso central é

importante que as moléculas não atravessem (UPADHYAY, 2014), segundo o modelo preditivo BOILED-Egg (Brain Or Método de permeação estimado intestinal).

A permeabilidade gastrointestinal pode ser ainda melhorada através da tecnologia farmacêutica com recursos sofisticados, como por exemplo, por conjugação com carreadores de drogas acessíveis (drug delivery) para promover a distribuição de drogas e a biodisponibilidade em circulação, como nanopartículas, nanovesículas e a ciclodextrina (ARRÚA et al., 2019).

Além disso, a impenetrabilidade do BBB enuncia uma provável neurotoxicidade nula dos compostos, ficando eles restritos à circulação e órgãos onde residem os parasitas. A única diferença estrutural entre os dois compostos mais bem classificados em termos de afinidades previstas para o sítio de ligação da cruzaina (composto 8: 67,63; composto 17: 67,44) reside na presença de um átomo de cloro como substituinte para a posição 2 em um dos compostos aromáticos.

Anéis no composto 17 que está ausente no composto 8. Adicionalmente, a estrutura dos compostos 8 e 17 difere dos demais compostos usados neste estudo por terem um grupo 4-Ph-Ph como substituinte.

Uma inspeção detalhada das interações intermoleculares revela que compostos que possuem anéis aromáticos adicionais, pela adição de um substituinte fenil (compostos 8 e 17) ou pela substituição de um dos grupos fenil por um grupo naftil (composto 9), produziram afinidades mais altas previstas para a cruzaina alvo.

Esse efeito pode estar relacionado ao aumento do número de átomos de carbono, melhorando os contatos hidrofóbicos com esses ligantes. Além disso, é importante notar que três dos cinco empilhamentos pi-pi observados ocorreram com ligantes que possuem esses anéis aromáticos adicionais, embora essas interações não tenham ocorrido com os substituintes fenil e naftil mencionados anteriormente.

Esses substituintes aromáticos adicionais podem desempenhar um papel importante ao conceder um deslocamento conformacional no sítio de ligação da cruzaina, melhorando as afinidades previstas para esses compostos específicos.

É importante investigar a ação dos compostos frente às formas evolutivas de *T. cruzi*, pois espera-se que os compostos sejam mais ativos que a droga de referência BZD (BUSTAMANTE; TARLETON, 2011). Todos os compostos demonstraram ter melhor IC₅₀ que a droga de referência frente a epimastigotas. Já para tripomastigotas, os compostos que demonstraram ter melhor atividade foram 4, 8, 10, 16 e 17 e para amastigotas foram 12 e 15.

Os genes repórteres codificam um produto genético, que permite facilmente visualizar o seu produto de expressão (produtos fluorescentes ou corados) e têm uma série de características que favorecem a sua função como: ausência de produção endógena, proteína sintetizada sem interação fisiológica na célula hospedeira e atividade proteica medida de forma simples, rápida e sensível (DUBE et al., 2009).

Esta tecnologia é uma ferramenta muito utilizada para monitorar o crescimento e a proliferação de bactérias, vírus e outros parasitas em estudos *in vitro* (ASHUTOSH et al., 2005). É também uma técnica promissora em estudos de progressão de doenças em modelos experimentais *in vivo*.

Atualmente os genes repórteres podem ser classificados como extracelular ou intracelular. Os produtos expressos intracelularmente ficam retidos dentro da célula que expressam, por exemplo: acetiltransferase (CAT), a B-galactosidase, lactamase, a proteína verde fluorescente (GFP) e a luciferase.

A luciferase é uma potente molécula repórter utilizada em triagens biológicas, codificada pelo gene *luc*, clonado do vaga-lume (*Photinus pyralis*), catalisa uma reação de bioluminescência que requer a luciferina como substrato, ATP, Mg^{2+} e O_2 . Na presença desses reagentes e mediante a ação da luciferase presente no lisado de células, ocorrerá uma reação de oxidação da luciferina com emissão de um flash de luz que decai rapidamente. O sinal luminoso é detectado por um luminômetro.

A emissão total de luz é proporcional à atividade da luciferase na amostra que, por sua vez, reflete a taxa de transcrição do gene "repórter" sob ação do promotor em estudo (LIN; BARBOSA, 2002).

O sistema *luc* tem algumas vantagens quando comparado aos outros sistemas usualmente empregados: apresenta uma sensibilidade 10 a 100 vezes superior, o processamento das amostras é bem mais rápido, não requer o uso de isótopos, apresenta atividade endógena desprezível em células de mamíferos.

Além de diminuir os erros manuais, possui alta reprodutibilidade, pode ser utilizada em testes de descobertas de novos fármacos em larga escala e como é distinguida facilmente das proteínas endógenas, pode ser utilizada como método de quantificação parasitária em experimentos *in vitro* e acompanhar a progressão da doença, como a determinação da carga parasitária em experimentos *in vivo*.

O seu ponto negativo é o alto custo do reagente para realizar a ação (PAZZAGLI et al., 1992; LIN C. J.; BARBOSA, A. S., 2002). Então a necessidade de novas moléculas, é muito importante a criação de cepas transgênicas que facilitem a seleção de novos compostos. Neste trabalho fizemos a amplificação dos genes da

luciferase e a sua subclonagem em vetor de expressão. Acreditamos que essa importante etapa ajudará no desenvolvimento de uma linhagem repórter de *T. cruzi* que expressa a luciferase de pirilampo (luc). Com isso teremos a sua futura utilização em sistemas de *screening* de drogas *in vitro*.

8. CONCLUSÕES

- a) Avaliamos a atividade citotóxica dos 16 compostos sintetizados em células macrofágicas (RAW 264.7). Todos os compostos apresentaram certo grau de toxicidade;
- b) Determinamos *in vitro* a atividade antiparasitária das 16 substâncias avaliadas sobre formas amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Elegemos como fármacos mais ativos os compostos 4, 8, 10 e 16.
- c) Os compostos mais ativos (4, 8, 10 e 16) mostraram concordância com a regra de Lipinski, e possuíram similaridade farmacológica quando comparados ao BDZ. Apresentaram ainda baixa permeabilidade com base na absorção gastrointestinal (GI), e não são permeáveis à barreira hematoencefálica
- d) Os compostos com maior afinidade predita pela cruzaina 8 e o 17 diferem dos demais pela presença de um átomo de cloro como substituinte na posição 2 de um dos anéis aromáticos. Além disto, estes dois ligantes diferem em relação aos demais compostos desta série pela utilização de um grupo fenil como substituinte em um dos anéis aromáticos.
- e) Iniciamos a criação de uma linhagem repórter de *Trypanosoma cruzi* bioluminescente.

9. PESPECTIVAS

- Repetir e analisar ensaios do perfil imunomodulador dos compostos;
- Obter a linhagem repórter de *T.cruzi* para ensaios de screening de substâncias com atividade anti- *T.cruzi*.

REFERÊNCIAS

- ABDALLA, G. K. THE ROLE OF IMMUNE SYSTEM IN CHAGAS DISEASE – A SHORT REVIEW. **Jornal de Ciências Biomédicas da saúde**. v. 3, n. 2 (2017).
- ALBAREDA, M. C.; LAUCELLA, S. A. Modulation of *Trypanosoma cruzi*-specific Tcell responses after chemotherapy for chronic Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 414-421, 2015.
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, L. A.; PESSINA, D. H. Importance of TNF- α in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 103, suppl I, p. 21-26, 2008.
- ANDRIANI, G. *et al.* Activity In Vivo of Anti-*Trypanosoma cruzi* Compounds Selected from a High Throughput Screening. **Plos one**, v 5, n 8, 2011.
- ARAÚJO, F. F. *et al.* Potential role of CD4⁺ CD25^{HIGH} regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Frontiers in bioscience: a journal and virtual library**, Tampa, v. 12, p. 2797-2806, 2006.
- AZAMBUJA, P.; GARCIA, E. O ciclo do *Trypanosoma cruzi* no inseto vetor. **Portal da doença de Chagas**, 2017.
- BAPTISTA, R. P. *et al.* Evidence of substantial recombination among *Trypanosoma cruzi* II strains from Minas Gerais. **Infect Genet Evol.** v. 22, p. 183-91, 2014.
- BATISTA, C. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reserosomes. **PloS one**, San Francisco, v. 10, n. 6, p. e0130165, 2015.
- BELLERA, C. L. *et al.* Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. **European journal of medicinal chemistry**, Paris, v. 93, p. 338-348, 2015.
- BELLERA, C. L. *et al.* Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. **European journal of medicinal chemistry**, v. 93, p. 338-348, 2015.
- BERGER, B. J, FAIRLAMB, A. H. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. **Parasitology** 105: 71-78, 1992.
- BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, Boston, v. 373, n. 5, p. 456-466, 2015.
- BILATE, A. M. B.; CUNHA NETO, E. Chagas Disease Cardiomyopathy: Current Concepts of an Old Disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 50, n. 2, p. 67-74, 2008.

BOARI, J. T. *et al.* IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 8, n. 4, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3343119/>. Acesso em: 16 jun. 2019.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO. Brasília: **Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 46, n. 21, mar. 2015. Disponível em <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/03/2014-020..pdf>. Acesso em: 18 jun. 2019.

BOSCARDIN, S. B. *et al.* Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J Cell Mol Med**. V.14, p. 1373–1384, 2010.

BOSQUESI, P. L. *et al.* Toxicidade de fármacos nitrofurânicos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 29, n. 3, p. 231-238, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica**. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacaoepidemiologica>. Acesso em: 17 nov. 2019.

BUSTAMANTE, J. M. E TARLETON, R. L. Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. **Expert Opinion on Drug Discovery**. Vol 6, 2011.

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

CANAVACI, A. M .C. *et al.* In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 7, p. e740, 2010.

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

CARDONI, R. L. E ANTÚNEZ, M. I. *Trypanosoma cruzi*: the expansion of NK, T, and NKT cells in the experimental infection. **Experimental Parasitology**. Vol. 106. p. 85–94. Março- abril 2004.

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

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (Estados Unidos da América). **Antiparasitic Treatment**. Disponível

em: http://www.cdc.gov/parasites/chagas/health_professionals/tx.html. Acesso em: 8 nov. 2019.

CHANDRA, M. et al. Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). **Internacional Journal Parasitology**. v. 32, p. 897-905, 2002.

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

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

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature* 465, 2010. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas do Ministério da Saúde em 2005, revisto em 2015 na forma do II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília. v. 25, p. 7-86, 2016.

COSTA, J. F. O. **Investigação de atividades anti-Leishmania amazonensis**, anti*Trypanosoma cruzi* e imunomoduladora de extratos de plantas do semi-árido brasileiro. 79 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

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

DAMBRIN C, KLUPP J, MORRIS R E. Pharmacodynamics of immunosuppressive drugs. **Current Opinion in Immunology** 12: 557-562, 2000.

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

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

_____. DESSOY, M.A.; SILVA, J.J.N. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, Vol. 10, p 1-14, 2009.

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

DOS SANTOS, P.V.A. et al. Prevalence of CD8⁺ $\gamma\delta$ T cells in *Trypanosoma cruzi* elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{low} LFA-1 high VLA-4 high activation phenotype and expression of IFN- γ inducible adhesion and chemoattractant molecules. **Microbes Infection**. n. 3, p. 971-984, 2001.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (Estados Unidos da América). **Tratamentos atuais**. Disponível em: https://www.dndial.org/wpcontent/uploads/2009/10/plataforma_informativo_port_1.pdf. Acesso em: 5 jun, 2019.

DU, X. et al. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent

Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **Journal of Medical Chemistry**, v. 45, n. 13, p. 2695-2707, 2002.

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

FARAL-TELLO, P. et al. Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. **Plos one**. 22 de Maio, 2014.

FERRAZ, M. L. et al. The Anti*Trypanosoma cruzi* Activity of Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas' Disease Is Less Dependent on Gamma Interferon than That of Benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 4, p. 1359-1364, 2007.

FIOCRUZ. PORTAL DA DOENÇA DE CHAGAS. **Tratamento**. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br/tratamento-2/>. Acesso em: 20 ago. 2019.

FLORES M G, ZHANG S, HA A, HOLM B, REITZ B A, MORRIS H, BORIE D. In vitro evaluation of the effects of candidate immunosuppressive drugs: flow cytometry and quantitative real-time PCR as two independent and correlated read-outs. **Journal of Immunological Methods**. V. 289, p. 123-135, 2004.

FREITAS, J. M. et al. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**. v. 2, n. 3, 2006.

GAO, W.; PEREIRA, M. A. Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. **International journal for parasitology**, New York, v. 32, n. 2, p. 167-170, 2002.

GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. The microbicidal activity of IFN- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and transforming growth factor- β . **Eur J Immunol**. n. 22, p. 2501-2506, 1992.

GIORGI, M. E. et al. Improved bioavailability of inhibitors of *Trypanosoma cruzi* transsialidase: PEGylation of lactose analogs with multiarm polyethyleneglycol. **Glycobiology**, Oxford, v. 22, n. 10, p. 1363-1373, 2012.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and immunity**, Washington, v. 71, n. 3, p. 1185-1193, 2017.

GOMES. Diagnóstico laboratorial. **Portal da doença de Chagas**, 2017.

GRAEBIN et al. Antiprotozoal agents: an overview. **Antinfective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 345 e 366, 2009

GUEDES, P. M. M. et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN- γ , TNF- α , and low IL-10 production

during the acute infection phase. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 130, p. 43-52, 2009.

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

JIMENEZ, V. *et al.* Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of cellular biochemistry**, v. 105, n. 3, p. 688-698, 2008.

KESSLER, R. L. *et al.* Stage-regulated GFP Expression in *Trypanosoma cruzi*: applications from host-parasite interactions to drug screening. **PloS one**, v. 8, n. 6, p. e67441, 2013.

LESSA, J. A. *et al.* Antimony(III) complexes with pyridine-derived thiosemicarbazones: Structural studies and investigation on the antitrypanosomal activity. **Polyhedron**. Vol. 30, p 372–380. 2011.

LIDANI ; BRENER, Z.; ANDRADE, Z.A.; BARRAL-NETTO, M. Book Review. **Rev. Inst. Med. trop.** S. Paulo, v. 43, n. 5, p. 300, 2001

LIEKE, T.; STEEG, C.; GRAEFE, S. E. B.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi* –infected fibroblasts. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 145, p. 357-364, 2006.

LIMA, L. *et al.* Evolutionary Insights from Bat Trypanosomes: morphological, developmental and phylogenetic evidence of a new species, *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *erneyi* sp. nov., in african bats closely related to *Trypanosoma* (Schizotrypanum) *cruzi* and allied species. **Protist**, Jena, v. 163, n. 6, p. 856-872, 2019.

_____, S.R. *et al.* Doença de chagas : uma atualização bibliográfica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, 2019.

LIN, C. J.; BARBOSA, A. S. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. **Arq Bras Endocrinol Metab**, São Paulo , v. 46, n. 4, p. 330-340, 2002.

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

MACHADO, F. S. *et al.* Pathogenesis of Chagas disease: time to move on. **Frontiers in bioscience** (Elite edition), Searington, v. 4, p. 1743-1758, 2013.

MAGALHÃES, L. M. D. *et al.* Differential activation of human monocytes and lymphocytes by distinct strains of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 9, n. 7, 2015. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosntds/article?id=10.1371/journal.pntd.0003816>. Acesso em: 30 nov. 2019.

MCKERROW, J. H. *et al.* Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, p. 263-269, 2008.

MENNA-BARRETO *et al.* Anti-*Trypanosoma cruzi* compounds: our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. **J. Braz. Chem. Soc.** vol. 25 n.10. São Paulo, 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. S. *et al.* Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 136, n. 05, p. 499-510, 2009.

MILLER, B. R.; ROITBERG, A. E. Design of e-pharmacophore models using compound fragments for the trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi*: screening for novel inhibitor scaffolds. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, New York, v. 45, p. 84-97, 2013.

_____. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a drug target against Chagas disease (American trypanosomiasis). **Future medicinal chemistry**, London, v. 5, n. 15, p. 1889-1900, 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Situação epidemiológica**. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/doenca-de-chagas/situacaoepidemiologica>. Acesso em: 5 set 2019.

Moncayo, A. e Yanine, M. I. O. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. Vol. 100, 2006.

MORAES, C. B. *et al.* Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. **Scientific reports**, London, v. 4, p. 4703, 2014.

MOREIRA, D. R. M. *et al.* Approaches for the development of new anti-*Trypanosoma cruzi* agents. **Current drug targets**, Hilversum, v. 10, n. 3, p. 212-231, 2009.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. **Nanomedicine**, London, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.

MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine*, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.

NAGAJYOTHI, F. *et al.* Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 14, n. 5, p. 634-643, 2012.

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

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

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Doenças tropicais**. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro_relatorio_oms_doencas_tropicais.pdf. Acesso em: 11 set 2019.

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

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Doença de Chagas**. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=417:doenca-de-chagas&Itemid=463. Acesso em 12 jul. 2019.

PAZZAGLI, M. *et al.* Use of bacterial and firefly luciferases as reporter genes in DEAE-dextran-mediated transfection of mammalian cells. **Anal Biochem**, 1992.

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

PÉREZ, A. R. *et al.* TNF- α is involved in the abnormal thymocyte migration during experimental *Trypanosoma cruzi* infection and favors the export of immature cells. **PLoS One**, San Francisco, v. 7, n. 3, 2012. Disponível em: <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0034360>. Acesso em: 8 nov. 2019.

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

_____. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' gastrointestinal disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Gastroenterol Hepatol**. V. 33, n. 3, p. 191-200. 17, 2010.

PORRÁS, A. I. *et al.* Target Product Profile (TPP) for Chagas disease point-of-care diagnosis and assessment of response to treatment. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 6, 2015.

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

RAMIREZ, J. *et al.* New insights into *Trypanosoma cruzi* evolution, genotyping and molecular diagnostics from satellite DNA sequence analysis. **Plos Neglected Tropical Disease**, 2017.

RASSI-JUNIOR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, London, v. 375, n. 9723, p.1388-1402, 2012.

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

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

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

_____. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cellular microbiology**, Oxford, v. 14, n. 10, p. 1522-1530, 2012.

SANDES, J. M. *et al.* Trypanosoma cruzi Cell Death Induced by the Morita-BaylisHillman Adduct 3-Hydroxy-2-Methylene-3-(4-Nitrophenylpropanenitrile). **PLOS One**, 8 de abril de 2014.

SOARES, M. B. P.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 73, n. 4, p. 547-559, 2001.

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

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

_____. CAMP analogues and cholera toxin stimulate the accumulation of nitrite in rat peritoneal macrophage cultures. **Eur J Pharmacol.** V. 266, n. 2, p. 125-129, 2007

TANOWITZ, H. B. Chagas' disease. **Rev. Clin Microbol.** Oct; 5(4): 400–419, 1992.

TARTAROTTI, *et al.* Vectorial problematic of the Chagas disease. **Arq. Ciênc. Saúde.** V. 11, n. 1, p. 44-7, 2004.

TEIXEIRA, A. R. L. et al. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 24, n. 3, p. 592-630, 2011.

_____. Evolution and pathology in Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, n. 5, p. 463-491, 2006.

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

TIBAYRENC, M. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. **Parasitol Today**. V.14, n. 8, p. 323-9, 1998.

_____. Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. **Kinetoplastid Biology and Disease**, London, v. 2, n. 1, p. 12, 2003.

TORRICO, F. HEREMANS, H.; RIVERA, T.; VAN MARCK, E.; BILIAU, A.; CARLIER, Y. Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol**. v. 146, p. 3626-3632, 1991.

WESTENBERGER, S. J. et al. Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **Genetics**. v. 171, n. 2, p. 527-43, 2005.

WHO, **Chagas disease** (American *trypanosomiasis*). Disponível em:

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em 26 de setembro de 2019.

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

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v.104, n. 7, p. 1051-4, 2009.

ZINGALES, et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 109, n. 6, p. 828–833, 2014.

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO(EUROPEAN JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY)

European Journal of Medicinal Chemistry 257 (2023) 115508



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ejmech



Research paper

1,3-Thiazole derivatives as privileged structures for anti-*Trypanosoma cruzi* activity: Rational design, synthesis, *in silico* and *in vitro* studies



Mabilly Cox Holanda de Barros Dias^{a,1,*}, Mayara Souza Barbalho^b,
Gevanio Bezerra de Oliveira Filho^a, Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso^c,
Ana Cristina Lima Leite^a, Aline Caroline da Silva Santos^b, Ana Catarina Cristovão Silva^b,
Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro^b, Danielle Maria Nascimento Moura^b,
Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira^a, Marcelo Zaldini Hernandez^a, Rafael de Freitas e Silva^{d,2},
Valéria Rêgo Alves Pereira^{b,**}

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

^b Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 50670-420, Recife, Pernambuco, Brazil

^c Universidade de Pernambuco, 56328-903, Petrolina, Pernambuco, Brazil

^d Universidade de Pernambuco, 50100-010, Recife, Pernambuco, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

1,3-thiazoles
Chagas disease
Trypanocidal agents
Bioisosterism
Cruzain
ADME prediction

ABSTRACT

Chagas disease is a deadly and centenary neglected disease that is recently surging as a potential global threat. Approximately 30% of infected individuals develop chronic Chagas cardiomyopathy and current treatment with the reference benznidazole (BZN) is ineffective for this stage. We presently report the structural planning, synthesis, characterization, molecular docking prediction, cytotoxicity, *in vitro* bioactivity and mechanistic studies on the anti-*T. cruzi* activity of a series of 16 novel 1,3-thiazoles (2–17) derived from thiosemicarbazones (1a, 1b) in a two-step and reproducible Hantzsch-based synthesis approach. The anti-*T. cruzi* activity was evaluated *in vitro* against the epimastigote, amastigote and trypomastigote forms of the parasite. In the bioactivity assays, all thiazoles were more potent than BZN against epimastigotes. We found that the compounds presented an overall increased anti-trypomastigote selectivity (Cpd 8 was 24-fold more selective) than BZN, and they mostly presented anti-amastigote activity at very low doses (from 3.65 μ M, cpd 15). Mechanistic studies on cell death suggested that the series of 1,3-thiazole compounds herein reported cause parasite cell death through apoptosis, but without compromising the mitochondrial membrane potential. *In silico* prediction of physico-chemical properties and pharmacokinetic parameters showed promising drug-like results, being all the reported compounds in compliance with Lipinski and Veber rules. In summary, our work contributes towards a more rational design of potent and selective antitrypanosomal drugs, using affordable methodology to yield industrially viable drug candidates.

1. Introduction

Chagas disease or American trypanosomiasis is a potentially deadly disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*). Human

infection occurs when the faeces of infected triatomine insects known as barbers are deposited in the skin [1]. Such transmission mechanisms and the endemic characteristics of this disease reveal a profile of endemicity in poverty areas, with a lack of an adequate sanitary system. Being

* Corresponding author. Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, 50740-520, Recife, Pernambuco, Brazil.

** Corresponding author.

E-mail addresses: mabillycox@gmail.com (M. Cox Holanda de Barros Dias), valeria.bernandes@focruz.br (V. Rêgo Alves Pereira).

¹ Present Address: Department of Chemistry, University of Warwick, Coventry, CV4 7AL, United Kingdom.

² Present Address: Division of Immunobiology, Institute of Immunology, Center for Pathophysiology, Infectiology and Immunology, Medical University of Vienna, Vienna, Austria.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115508>

Received 15 February 2023; Received in revised form 12 May 2023; Accepted 18 May 2023

Available online 19 May 2023

0223-5234/© 2023 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

prevalent in underdeveloped populations and countries, it is a neglected disease by the worldwide pharmaceutical industry. In fact, about 6–7 million people are estimated to be infected around the globe [1], and it is endemic in 21 countries across Latin America. The disease is also present in other emergent and developed countries in the world [2], spread through human migration and arising as a potential global threat [3].

The current treatment of choice for Chagas disease is the first-line drug Benznidazole (BZN) or the second-line drug Nifurtimox, which has broader side effects. Clinically saying, chagas disease has two different phases of infection - early phase/acute phase, when the parasites at the trypomastigote stage are circulating in the blood of the infected host, and late phase/chronic phase, in which the parasite penetrates specific tissues and multiplies at the amastigote stage. When administered in the acute phase, treatment with BZN is usually satisfactory, leading to cure. However, in the chronic phase, when the parasite is inside the host's tissues, BZN is ineffective in removing parasitism. In addition, many patients are intolerant to treatment with BZN, with toxic effects appearing within the long-term standard

treatment [1,4]. Furthermore, the treatment is considerably long (twice a day tablets for 60 days) and with several warnings, such as genotoxicity and carcinogenicity potential, plus adverse reactions such as 25% incidence of abdominal pain [5]. Given these reasons, there is an urgent need to develop new effective and safer therapeutic drugs for the treatment of Chagas disease [6,7]. Our group recently published a review article on strategies assessed *in vivo* against neglected diseases over the period of 2015–2021, including Chagas disease [8]. It was shown that the most successfully assessed structures *in vivo* were heterocyclic nuclei and metal-based compounds. The Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi), a non-governmental organisation that focuses on developing therapies and diagnostic tools for neglected diseases, is currently carrying on a Phase I study on an analogue compound of acoziborole, of the oxaboroles heterocyclic nuclei that active *in vivo* against Chagas disease [9].

The growing knowledge of the basic biology of *T. cruzi* has allowed the use of more rational approaches for the development of antichagasic drugs. A useful and proven strategy is to develop potential inhibitors of

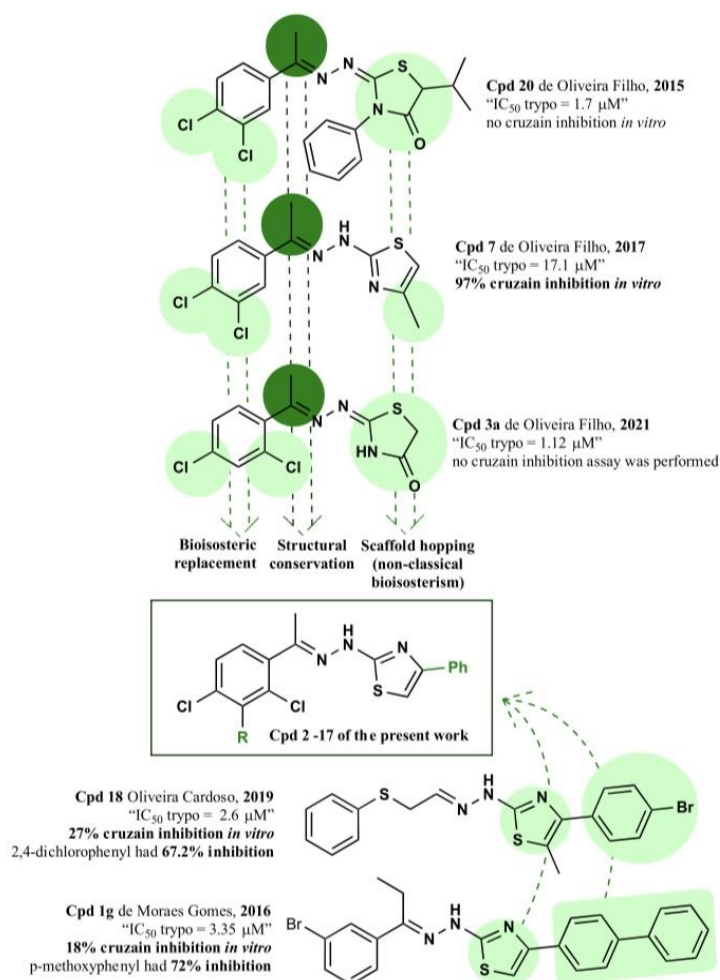


Fig. 1. Structural planning strategies utilized applied the present work to design the series of 1,3-thiazoles 2–17 [15,21,27–29].

the *T. cruzi* enzyme cruzain, which is absent in the mammalian host [10, 11]. This enzyme is the main protease of the parasite, expressed at all stages of the parasite's life cycle and plays a fundamental role during infection in host cells. Given this, cruzain is considered an important and selective molecular target for the development of new antichagasic drugs. In this regard, our group has been searching for anti-*T. cruzi* compounds using the structure of the cruzain enzyme as a target model. During those screenings, we have tested organic and inorganic synthetic compounds, mainly heterocycles [11–20], and have found a diversity of therapeutically relevant bioactivities.

Following our continuous progress on thiosemicarbazone compounds, a series of potent antichagasic thiazolidinones were identified [21]. After a few attempts at molecular modifications and progressive upgrades, we obtained excellent selectivity results with cyclic 4-thiazolidinone derivatives of 3,4-dichlorophenyl thiosemicarbazone, demonstrating that cyclization of thiosemicarbazone increases selectivity and decreases cytotoxicity whilst maintaining anti-*T. cruzi* activity compared to non-cyclic structures [21]. The thiazole ring is a heterocyclic nucleus that has been frequently described as a potent trypanocidal agent [8,18, 22–26]. Thus, we also assessed the scaffold hopping of the thiazolidine-4-one ring to the 1,3-thiazole bioisostere, and we found excellent percentages of cruzain *in vitro* inhibition in a competition based assay [27]. Furthermore, other attempts on functionalised 1,3-thiazoles also showed interesting cruzain inhibition profiles *in vitro* and good trypanocidal activity [15,28].

Based on these earlier results, in the current work, we investigated the scaffold hopping of the thiazolidin-4-one heterocycle, with proven trypanocidal activity, for the 1,3-thiazole heterocycle making a bioisosteric exchange on the 1,3-thiazole substitution (Fig. 1), following up on the optimization proposed by de Moraes Gomes et al. (2016), de Oliveira Filho et al. (2017) and de Oliveira Filho et al. 2021 [18,27,29]. Our compounds 2–17 were designed to vary the group linked to position 4 of the thiazole ring through the functionalization with aromatic rings bearing different substitutions patterns.

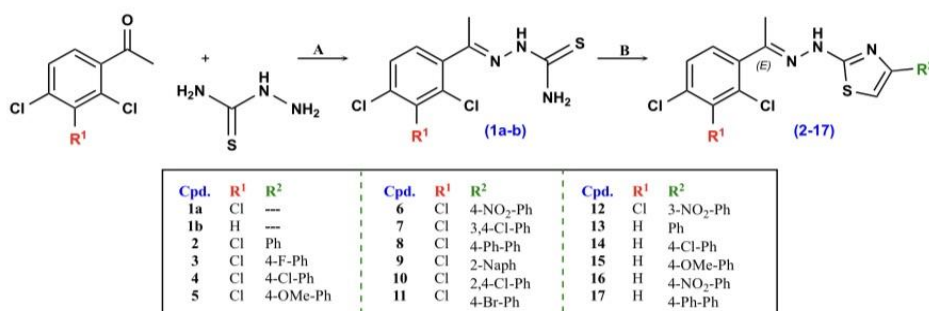
In this work, we kept the C5 methylation pattern on the thiosemicarbazone portion and explored the bioisosteric replacement on the chlorination patterns of the attached phenyl ring. Mostly, we aimed to assess the impact of the 1,3-thiazole functionalization patterns in combination with the halogenated phenyl on the trypanocidal activity of our derivatives. The 1,3-thiazoles were obtained from 2,3,4- trichloro phenyl-thiosemicarbazide (1a) or 2,4-dichlorophenyl thiosemicarbazide (1b) on the left side of the molecules. As structural guides, we initially exploited phenyl-phenyl substitution and p-bromo-phenyl substitution, as well as other patterns, as these were proven beneficial to trypanocidal activity on previous works ([15,27,28]). Our synthesised compounds were docked *in silico* against cruzain, an important *T. cruzi* molecular target, to predict potential intermolecular interactions. Further

mechanistic assays on cell death and mitochondrial/DNA damage were also done to glimpse the action of the series in a primary level. *In silico* prediction of drug-likeness was also performed to exploit the potential of the series as drug candidates against the calculated physicochemical and ADME parameters that fit to a market drug. With this, we aimed to identify compounds with greater potency and selectivity than BZN to treat Chagas disease infection and contribute towards the rational design of future antichagasic drugs.

2. Results and discussion

2.1. Synthesis and chemical characterization

Once the structural planning was carried out, we proceeded towards the synthesis of the proposed compounds. Scheme 1 presents the sequence of reactions involved in the synthesis of the novel thiazoles. Compounds 2–17 were synthesised via Schiff-base condensation, in a simple 2-step chemical reaction based on Hantzsch [30] synthesis strategy and on a previous work published by our group [21], with adaptations where necessary. Firstly, thiosemicarbazides (1a–b) were prepared by reacting commercially available 2,3,4- trichloro acetophenone or 2,4- dichloroacetophenone (1eq) with thiosemicarbazide (1eq), in ethanol (0.1 M) under ultrasonic bath (RT, 30 min to 2 h) in the presence of catalytic amounts of H₂SO₄ (0.2%). After synthesis, the thiosemicarbazones (1a–1b) were recrystallised in ethanol. Thiazoles (2–17) were prepared by reacting the respective aryl thiosemicarbazones (1a or 1b, 1 eq) with commercially available α -halo acetophenones (1.1 eq), in isopropanol (0.05 M) under reflux conditions (85 °C for 2–6 h). These reactions were carried out in the presence of an excess of anhydrous sodium acetate (3 eq), affording compounds in variable yields (22–75%) and acceptable purity (>95%). Compounds were washed with cold water and cold isopropanol and dried under vacuum, with further drying over SiO₂. Recrystallisation was carried out in isopropanol or water where necessary. The chemical structures of compounds were determined by nuclear magnetic resonance (NMR, ¹H and ¹³C) and infrared (IR). Based on previously synthesised and crystallised compounds of this type by our group, we suggest that the C2=N2 double bond on the hydrazine moiety is *E*-configured [13,19–21,27,29, 31,32]. Plus, another interesting feature of these compounds is the imino-lactam tautomerism on the 'C2=N3 bond, which in this series is endocyclic due to the absence of a voluminous substituent in N3 [27]. The analysis of ¹H and ¹³C NMR spectra of compounds (2–17) has highlighted signals relating to the methine located at the C-4 position in the heterocyclic ring, which are diagnostic for this class of compounds. In NMR ¹³C, the representative methine carbon 'C4 of thiazole ring is approximately located at 105 ppm. In IR, the presence of the band relating to iminic links as well as the absence of absorption in the



Scheme 1. Synthetic route of proposed compounds. (A) 1a and 1b (chloroacetophenones, thiosemicarbazide, Ethanol, H₂SO₄)) RT for 30 min to 2 h); (B) 1,3-thiazoles 2–17 (1a or 1b, halo acetophenones, isopropanol, reflux at 85 °C for 2–6 h, excess of sodium acetate).

carbonyl region are also suggestive of the formation of compounds (2–17) and consumption of the halo acetophenone. In the NMR ^1H of compounds (2–17), the chemical shift of the N-H presents a median of 4.87 ppm (DMSO- d_6). A representative assigned ^1H and ^{13}C NMR spectrum of compound 13 is presented in Fig. S1 of supplementary Material, as well as remaining characterisation data of the 1,3-thiazole series.

2.2. Molecular docking studies on cruzain

Given our previous works indicating cruzain as one of the possible molecular targets of 1,3-thiazoles derived from thiosemicarbazones [15, 27,28], we performed *in silico* molecular docking studies to predict the potential intermolecular interactions of our synthesised compounds with the cruzain enzyme. As the experimental data that indicates that the C2=N2 double bond on the hydrazine moiety is E-configured, only the (E) isomer of each compound was considered in this discussion. Regarding the predicted affinities of these compounds on the cruzain binding site, the docking score (ChemPLP) values have ranged from 51.48 (cpd 4) to 64.82 (cpd 8), showing a difference of 13.34. Compound 8 (Fig. 2a) performed hydrophobic contacts with the residues GLY23, CYS25, TRP26, LEU67, MET68, VAL137, HIS162, GLU163 and GLU208. Compound 17 (Fig. 2b) performed a pi-pi stacking (T-shaped) with the residue TRP26 and hydrophobic contacts with the residues GLY23, CYS25, LEU67, MET68, ASN69, ALA136, VAL137, HIS162, GLY163 and GLU208. It is important to note that both molecules performed interactions with roughly the same residues, differing on the kind of interaction performed with the residue HIS162, which was a pi-pi stacking with the compound 17, while it was a hydrophobic contact with the compound 8, and the fact that the compound 17 performed hydrophobic contacts with two additional residues (ASN69 and ALA136).

Moreover, the following amino acid residues performed important interactions, stabilizing these compounds on cruzain's binding site: i)

TRP26: performed 3 pi-pi stackings and performed hydrophobic contacts with many compounds; iii) GLY23, GLY65, LEU67, MET68, ALA138, LEU160 and GLU208, performed hydrophobic contacts with a large number of compounds. The only structural differences between the two top ranked compounds in terms of predicted affinities for the cruzain binding site (compound 8: 64.82; compound 17: 60.82) resides on the presence of a chlorine atom as substituent for the position 3 on one of the aromatic rings on the compound 8 that is absent on the compound 17.

Additionally, the structure of compounds 8 and 17 differs from the remaining compounds used in this study for having a 4-Ph-Ph group as substituent. A detailed inspection on the intermolecular interactions reveals that compounds possessing additional aromatic rings, by adding a phenyl substituent (compounds 8 and 17) or by replacing one of the phenyl groups for a naphthyl (compound 9) group, the 4th ranked compound, yielded higher predicted affinities for the cruzain's binding site. This effect could be related to the increasing of the number of carbon atoms, improving the number of hydrophobic contacts with these ligands can perform. Besides, it is important to note that three out of five pi-pi stackings that have been observed occurred with ligands that possess these additional aromatic rings. These additional aromatic substituents could play an important role by granting a conformational displacement at this binding site of cruzain, improving the predicted affinities for these specific compounds.

Although 1,3-thiazoles derived from thiosemicarbazones have previously shown to be active *in vitro* against cruzain [15,17,27,29], we also noticed that the enzyme likely not the sole target of this class of compounds. Thus, our docking studies mapped the important molecular interactions of the compounds with this relevant target, but not excluding other molecular targets such as ergosterol biosynthesis [17, 28]. Hence, we performed mechanistic studies on a cell level, evaluating the ability of our class of compounds to induce parasite cell death and effect mitochondrial and DNA damage.

2.3. Bioactivity evaluation against *T. cruzi* parasite evolutionary forms

After structural characterisation of 1,3 thiazoles, the antiparasitic and host cell cytotoxicity was determined. Anti-proliferative activity was evaluated against epimastigotes of *T. cruzi* Dm28 strain, as well as Y strain trypomastigotes, and tulahuén strain-derived amastigotes. Cytotoxicity was determined in RAW 264.7 macrophages and results were expressed as μM in terms of IC_{50} and CC_{50} values, with the reference drug used being BZN. Compounds which exhibited lower IC_{50} than BZN in this assay were considered significant anti-*T. cruzi* agents. All results can be seen on Table 1.

As we can see in Tables 1 and 1,3-thiazoles derived from 2,4-dichloro-fenil thiosemicarbazide seemed to yield better anti-epimastigote activity (15 vs 5, 16 vs 17, 13 vs 2, and 14 vs 4), whereas their 2,3,4-trichloro-phenyl congeners yielded better anti-trypomastigote (4 vs 14, 7 vs 16, 8 vs 17, 2 vs 13, and 5 vs 15) and anti-amastigote (4 vs 14, 8 vs 17, 2 vs 13, and 7 vs 16) activity. Regarding cytotoxicity in macrophages, most of the thiazoles were between the 27.8 μM (Cpd 5) to 97.3 μM (Cpd 16) interval of toxicity, with some of them exhibiting toxicities at higher concentrations than BZN cytotoxicity. For instance, compounds 6, 8, 9, 14, 16 and 17 presented $\text{CC}_{50} > 44.18 \mu\text{M}$.

In the assay of the antiproliferative activity against epimastigotes form, all compounds were more active than BZN and were able to inhibit epimastigote proliferation. On a note, 9 out of the 17 compounds showed $\text{IC}_{50\text{epi}}$ lower than 10 μM . Concerning the activity of compounds against trypomastigote form, the IC_{50} values revealed that compounds 8 (2.64 μM), 4 (3.27 μM), 10 (4.08 μM), and 16 (4.82 μM) were at least 10-fold more potent than BZN. Compounds 2, 14, and 17 were twice more active than BZN.

It could be observed that the thiazoles exerted a relatively improved anti-trypomastigote activity in terms of selectivity, being compound 8

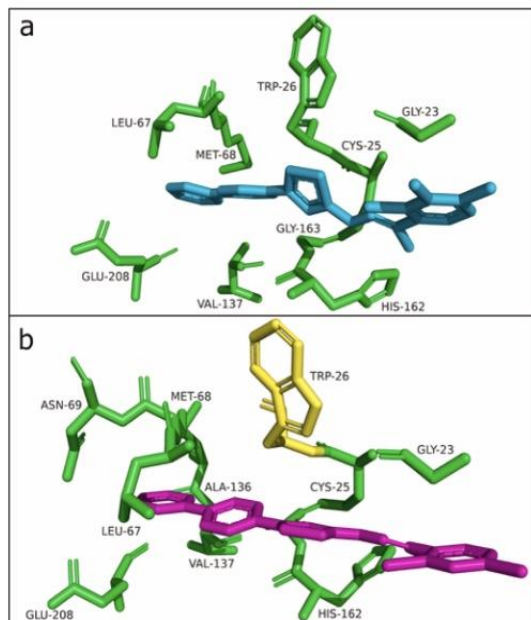


Fig. 2. The intermolecular interactions between the cruzain binding site and the compounds (a) 8 (cyan) and (b) 17 (magenta). The binding site residues are colored according to the type of interaction: pi-pi stackings (yellow) and hydrophobic contacts (green).

Table 1

Cytotoxicity of derivatives in RAW 264.7 macrophages cell line and inhibitory activity against *T. cruzi* epimastigote (Dm28 strain), trypomastigotes (strain Y) and amastigotes (Tulahuen strain). The results are expressed in micromolar concentrations. IC₅₀ = inhibitory concentration to 50% of the parasite population; CC₅₀ = cytotoxic concentration to 50% of the mammalian cells population; SI = selectivity index, calculated by dividing the CC₅₀ for the IC₅₀. ND = non determined.

Cpd	CC ₅₀ (μM)	IC ₅₀ (μM)			SI		
	RAW 264.7	Epi	Trypo	Ama	Epi	Trypo	Ama
2	30.19	13.84	11.54	20.58	2.18	2.61	1.46
3	42.22	19.44	21.48	27.9	2.17	1.96	1.51
4	39.65	10.63	3.27	8.71	3.73	12.12	4.55
5	27.08	7.88	30.86	7.84	3.43	0.87	3.45
6	88.49	28.95	ND	45.27	3.05	ND	1.95
7	44.9	32.15	25.45	25.45	1.39	1.76	1.76
8	62.24	8.62	2.64	12.88	7.22	23.57	4.83
9	96.24	10.86	65.96	25.38	8.86	1.45	3.79
10	36.29	8.33	4.08	13.57	4.35	8.89	2.67
11	29.85	5.25	ND	5.96	5.68	ND	5.00
12	29.22	8.42	ND	4.46	3.47	ND	6.55
13	42.81	7.42	45.93	21.34	5.76	0.93	2.00
14	55.12	7.55	17.9	10.57	7.30	3.07	5.21
15	43.15	3.48	45.29	3.65	12.39	0.95	11.82
16	97.3	6.41	4.82	28.26	15.17	20.18	3.44
17	80.12	20.2	10.56	14.88	3.96	7.58	5.38
BZN	44.18	56.94	40.96	5.64	0.77	1.07	7.83

the most selective of all compounds (24 times more selective to trypomastigote form, compared to the low selectivity of **BZN**, 1x. Five compounds of the series displayed selectivity higher than 7-fold towards trypomastigotes (cpds **8**, **16** was 20x, **4** was 12x, **10** was 9x and **17** was 8x), all compounds having either a mono or dichlorinated, or phenylated pattern of substitution on the 1,3-thiazole ring. The nitro-substituted compounds (cpd **6** and cpd **12**) and the 4-bromo substituted compound (cpd **11**) had no activity detected against trypomastigotes, and cpd **9** with a naphthyl-substituted thiazole interestingly showed a relatively low anti-trypomastigote activity (65.96 μM). Noticeably, the 2,4-dichlorophenyl thiazole substitution pattern (cpd **10**) resulted in a better anti-trypomastigote activity across all forms when compared to 3,4-dichlorophenyl thiazole (cpd **7**), being 2-fold (amastigote), 4-fold (epimastigote) or even 5-fold (trypomastigote) more potent than its congener.

Regarding anti-amastigote activity, compound **15** exhibited the best IC₅₀ama value (3.65 μM, 12x more selective towards the parasite), being more active than the standard drug, **BZN** (5.64 μM, 8x more selective). For the anti-amastigote activity, although most of the compounds presented relatively low IC₅₀ama values (all <28.26 μM except cpd **6** at 45.27 μM), only two (cpd **15** and cpd **12**) were more selective than the standard **BZN**. Compounds **11** (5.96 μM) and **12** (4.46 μM) exhibited equipotent activity compared to **BZN**. Interestingly, the previous inactive 3-nitro compound **12** demonstrated significant activity (selectivity of 6.6) and its 4-nitro congener showed a relatively weaker activity at 45.27 μM. Similarly, the previously inactive against trypomastigotes p-bromo cpd **11** presented activity like **BZN** (IC₅₀ama = 5.96 μM). A summary of the structure-activity relationship can be seen on Fig. 3.

Aligning the *in silico* docking studies on cruzain with the biological activity results, our biological activity findings align with the importance of the hydrophobic interactions of the 1,3-thiazole substitution and the pi-pi stacking with His162 on the phenyl head (given the high anti trypomastigote and anti epimastigote activity of cpd **8** and cpd **17**) [28,32]. Plus, tri-chlorinated cpd **8** from **1a** had the most potent anti-trypomastigote activity, as well as di-chlorinated cpd **17** (to a lesser extent), in agreement with the studies, where it was found that tri-chlorinated phenyl-hydrazone moieties favour cruzain binding. Although not strongly bound on docking analysis, cpd **4**, **10**, and **16** were at least 4-fold more potent than **BZN**. Some non-conservative changes on family II cruzain were previously reported to be found

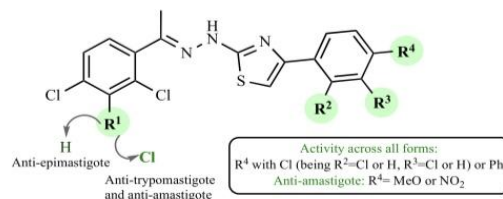


Fig. 3. Summary of the structure-activity relationship of 1,3-thiazole series based on their *in vitro* biological activity against trypomastigotes, amastigotes and epimastigotes of *T. cruzi*.

on Leu67, Met68 and Ala138 [33], which correlatively were found to be the only residues to interact with cpd **9** (naphthyl). This aligns with the low activity found for cpd **9** for trypomastigotes and amastigotes, but significant (10.86 μM) for epimastigotes (where *czp1* is mainly expressed). Furthermore, this result also corroborated with de Moraes Gomes (2016), where it was found that 1,3-thiazoles functionalised with naphthyl had depleted anti-trypomastigote activity in comparison to its p-methoxyphenyl and p-phenyl-phenyl congeners, possible due to the reduced bond flexibility of the group [28].

2.4. Flow cytometry analysis

2.4.1. Apoptotic parameters - annexin V and 7AAD assay on trypomastigotes

Given that metacyclic trypomastigotes are the mammalian infective form of *T. cruzi*, anti-trypomastigote activity is mainly evaluated when investigating potential anti-*T. cruzi* compounds. Evaluation of apoptosis and necrosis by flow cytometry is usually accomplished by the combined use of annexin V (AV)-FITC and 7AAD. Annexin V-FITC accesses phosphatidylserine molecules exposed on the external membrane in the early stage of apoptosis, and 7AAD allows the identification of nuclear alterations in the late stages of apoptosis or necrosis, because of the increase in membrane permeability. Most cells positive for AV were also 7AAD positive, suggesting that apoptotic cells evolved into secondary necrosis (representative Fig. S2 in supplementary material). As shown in Fig. 4, all compounds tested induced significantly less early apoptosis (annexin V+ 7AAD-) compared to the standard drug **BZN** in both concentrations tested. In terms of late apoptosis/necrosis, all the compounds tested with 1 x IC₅₀ induced lower levels of late apoptosis/necrosis when compared to **BZN**. Nonetheless, when 2 x IC₅₀ was tested, the compounds **7** (at 50.9 μM), **9** (at 131.92 μM) and **16** (at 9.64 μM) displayed higher levels of late apoptosis/necrosis when compared to **BZN** (40.96 μM). Therefore, we suggest that the series of 1,3-thiazole compounds herein reported causes parasite cell death through apoptosis. This agrees with the current literature, that establishes apoptosis as a usual mechanism for thiazoles in the light of their predicted cruzain inhibitory activity [17, 24,27]. Noticeably, compound **16** (3,4-dichlorophenyl-1,3-thiazole from **1b**) exerted significant apoptotic activity on both stages (early by 5-fold and late by 4-fold more potent than **BZN**) whilst having one of the relatively lowest cytotoxicity among the 16 compounds (CC₅₀ = 97.3 μM).

2.4.2. Mitochondrial and DNA damage parameters - rhodamine and acridine orange assays

To determine whether the activity of the compound series on parasites was related to an alteration of the mitochondrial membrane potential, we performed flow cytometry using Rho 123 staining and acridine Orange. As it can be observed in Fig. 5, the cells treated with the compounds **3**, **9** or **16** in 1 x IC₅₀ or 2 x IC₅₀ had significantly less damage to the mitochondria than the standard drug **BZN**, when evaluated through this method. Increased levels of mitochondrial damage

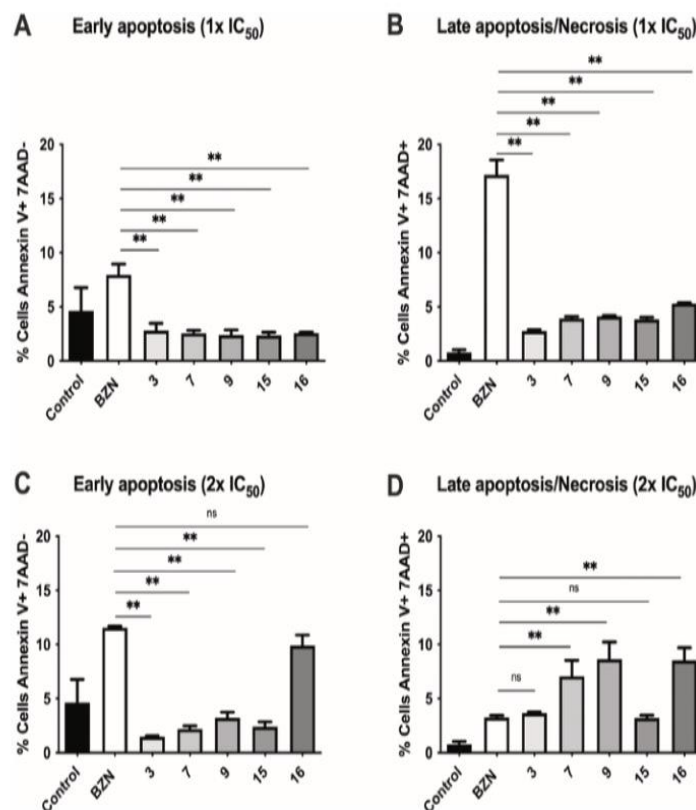


Fig. 4. Effects of compounds 3, 7, 9, 15 and 16 treatments on Annexin V-FITC/7AAD labelling of Trypomastigotes. A,C Early apoptosis cells which are annexin V+ and 7AAD-. B,D Late apoptosis/necrosis cells which are annexin V+ and 7AAD+.

were observed when parasite cells were treated with the compounds 7 (3,4-dichlorophenyl-1,3-thiazole from **1a**) and 15 (4-Methoxyphenyl-1,3-thiazole from **1a**) when tested in 1 x IC₅₀ or 2 x IC₅₀, although no statistically significant difference was observed. Therefore, data suggests that the compounds 9 and 16 induce increased levels of late apoptosis (Fig. 4D) but without compromising the mitochondrial potential for the time point tested (overlay flow cytometric histograms are in Fig. S3 of supplementary material).

The analyses of DNA damage (Fig. 6) indicated that compound 3 when tested in 1x IC₅₀ and 2x IC₅₀ induced higher DNA damage effects in the parasite when compared to the standard drug BZN. However, the other compounds did not induce increased levels of DNA damage when compared to BZN. The compound 16 in 2x IC₅₀ induced increased levels of DNA damage, although not significant, but also higher levels of early apoptosis and late apoptosis when compared to reference BZN when used at a much higher dose (Fig. 4C and D). Therefore, we postulate that DNA damage might be involved in the mechanism of action of compound 16 (3,4-dichlorophenyl-1,3-thiazole from **1b**) and potentially other 1,3-thiazoles in the series, although further experiments with tuned experimental conditions are necessary.

To add, given the relatively less potent apoptotic activity of the remaining thiazole derivatives combined with their significant IC₅₀ activity, our findings indicate that functionalised 1,3-thiazoles may have other biological targets in the *T. cruzi* system [17,28,34] beyond its known anti-cruzin potential. A few possibilities would be the glycolytic pathway by inhibition of triosephosphate isomerase dimer formation, sterol biosynthesis via inhibition of the sterol 14-demethylase (CYP51), and/or oxidative stress (superoxide dismutase and trypanothione reductase), given the nitro heterocyclic/azole and hydrophobic characteristics of the analogues [35,36]. This agrees with previous studies published by our group [15,17,28] and highlights the versatility of this

drug building block. Further studies to assess other *T. cruzi* targets for this series of 1,3-thiazoles will be conducted to better exploit its potential.

2.5. Physicochemical and predicted ADME parameters

In the process of drug discovery and design, promising molecules are expected to show high biological activity, with low toxicity and optimal ADME properties. The ADME parameters can be estimated through *in silico* approaches, using its molecular structure for predictions. Thus, the SMILES notation for all molecules investigated here were submitted to SwissADME to calculate the physicochemical descriptors, the predicted pharmacokinetic properties and drug likeness for all compounds. Many physicochemical descriptors are explored nowadays as indicators of drug likeness when rationalised through rules, such as Lipinski's rule of five (Lo5, or Pfizer filter), Veber rule (VR, GlaxoSmithKline filter), Ghose filter (GF, Amgen filter) and Muegge rule (MR, Bayer filter). Most widely applied in small synthetic molecules' libraries, Lipinski's rule of five proposes that drug-like compounds to be orally administered should have no more than one violation of its defined parameters. Veber's rule expanded to include rotatable bonds and polar surface area in the calculation [19]. For Lo5, a compound obeying at least three of the four criteria can adhere to the rule [18]. Within the thiazoles synthesised in this work, all the reported compounds fit in Lo5 and VR rule, and each one of them presented no or one violation to each of the other rules (Egan, Muegge and Ghose), which was LogP > 5.

Moreover, a particularity observed was that most of compounds with TPSA > 74.75 Å showed higher values for IC₅₀ across all parasite forms tested. Interestingly, all compounds were predicted to have a consensus LogP higher than BZN (cLogP = 0.49, whereas compounds ranged from 4.73 to 6.88), which might be beneficial to their anti-amastigote

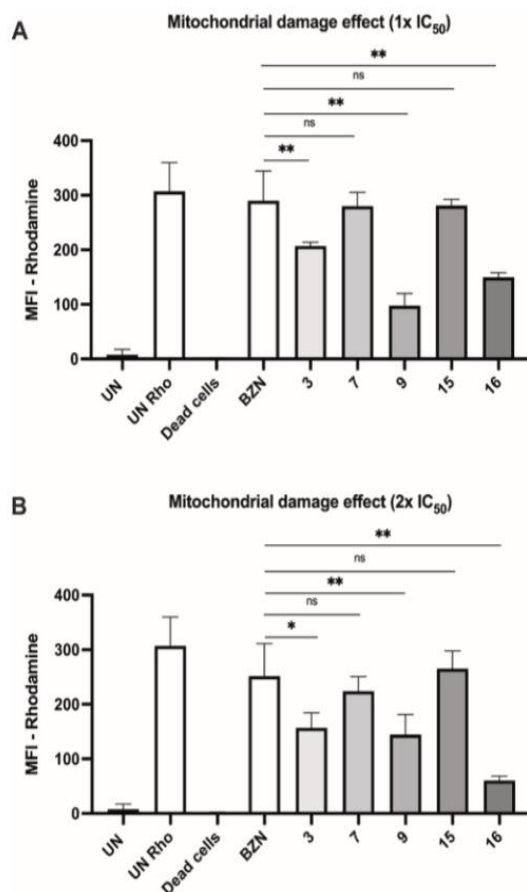


Fig. 5. Effect of compounds 3, 7, 9, 15 and 16 on the mitochondrial membrane potential of Trypomastigotes. (A) 1x IC₅₀ and (B) 2x IC₅₀.

activities. An issue that hinders BZN application on chronic-phase infections is the accessibility to the intra-tissue amastigote form, which can be more achievable by compounds with higher LogP. Given that all compounds presented relatively potent anti-amastigote activity (IC_{50ama} ranging between 45.27 and 3.65 μ M), their molecular properties may be proven beneficial to the bioactivity over BZN. A summary of predicted parameters can be found in Table S1 of supplementary material.

The SwissADME tool also provides predictions regarding pharmacokinetic properties such as gastrointestinal absorption, blood barrier permeability, Pgp substrate likeability and a few cytochrome (CYP) inhibition predictions. Compound 2, with moderate activity against all parasite forms, is predicted to have a high GI absorption rate, as well as compounds 5, and 13–15 that were active against epimastigotes. Interestingly, most of the reported compounds were predicted as non-Pgp substrates, except from compounds 8, 9 and 17 that have the phenyl or the naphthyl ring as para-substituents. Most compounds in the library were predicted to inhibit CYP2C9 and CYP2C19 (14 and 13 compounds each), no compounds would be CYP2D6 inhibitors, 9 compounds would be CYP1A2 inhibitors, and 7 compounds would be CYP3A4 inhibitors. The most active compounds against trypomastigotes (4, 8, 10 and 16) are not permeant to the blood-brain barrier, according to the BOILED-Egg predictive model (Brain Or Intestinal Estimated permeation method). Although most compounds were predicted to not be GI permeant, the gastrointestinal permeability can be further improved, for example, by conjugation with affordable drug carriers to

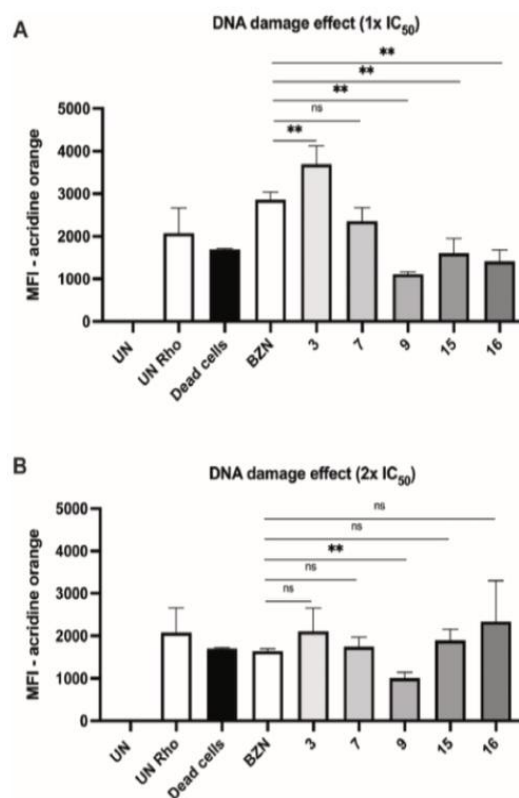


Fig. 6. A-B Effects of the compounds 3, 7, 9, 15 and 16 treatments on the nucleic acid of Trypomastigotes.

promote drug delivery and bioavailability in circulation. Furthermore, the impenetrability of the BBB enunciates the probably null neurotoxicity of the compounds, being them restricted to the circulation and organs where the parasites reside.

3. Conclusions

Herein we reported the structural optimization and rational planning of a series of 1,3-thiazoles (2–17), using the scaffold hopping and bioisosterism approaches, being synthesised via an accessible two-step methodology from functionalised thiosemicarbazones (1a–1b). *In silico* analysis englobed molecular docking predictions on the cruzain binding site and molecular properties predictions. The molecular docking studies aimed to investigate the intermolecular interactions of the series with the cruzain binding site, and indicated high predicted binding affinity for some of the thiazoles which bioactivity was proven later by the *T. cruzi* IC₅₀ assays. Furthermore, the ligand-receptor binding mode analysis showed the importance of pi-pi stacking on the 1,3-thiazole substituent. Molecular properties and drug-likeness analysis showed that the molecules comply with the main drug design rules, are predicted to be non-toxic to the blood-brain barrier, most are non-Pgp substrates and have potential cytochrome inhibitory activity. Notwithstanding, most of the compounds were active against all forms of the parasite, with highlights to compound 16 and 8 among trypomastigotes and epimastigotes, and compound 15 for greater amastigote selectivity. We found that the 1,3-thiazoles derivatives rationally planned and synthesised in this work predictably bind to cruzain *in silico*, being it one of its potential molecular targets, and may cause parasite cell death through apoptosis, but without compromising the mitochondrial

membrane potential. The DNA damage assay showed that compound **16** induced damage at a concentration 5x lower than the reference **BZN**. The synthesis, rationale, *in silico* and biological analysis herein reported broadens the way for future improvement and rationalisation of bioisosteric analogues of functionalised 1,3-thiazoles derived from thiosemicarbazones and the expansion of the anti-tripanosomal biological targets of this class of molecules.

4. Experimental protocols

4.1. Reagents and spectral analysis

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 (silica gel 60 F₂₅₄ in aluminium foil). The compounds were differentiated regarding their melting points and retention factors. Melting point (M.p.) was observed through a Fisatom model 430 D 60Hz fusimeter, and retention factors (Rf) were calculated by silica gel 60 CCD using a 7:3 system (hexanes: Ethyl Acetate) in solvent N, N-Dimethylformamide, with ultraviolet light at a wavelength (λ) of 254 nm as a revealer. DMSO-*d*₆ or D₂O were purchased from CIL. Chemical shifts are reported in ppm, and multiplicities are given as s (singlet), d (doublet), t (triplet), q (quartet), m (multiplet), and dd (double doublet), and coupling constants (J) in hertz. NH signals were localised in each spectrum after adding a few drops of D₂O. Structural assignments were corroborated by DEPT analysis. Mass spectrometry experiments were performed on a Q-TOF spectrometer LC-IT-TOF (Shimadzu). When otherwise specified, ESI was carried out in the positive ion mode. Reactions in an ultrasound bath were carried out under a frequency of 40 kHz (180 W) and without external heating. The elucidation and confirmation of the chemical structure of the compounds were done in partnership with the Department of Fundamental Chemistry (DQF - CCEN) of UFPE by NMR of ¹H (300 MHz/400 MHz, DMSO-*d*₆), NMR of ¹³C and DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆).

4.1.1. General procedure for the synthesis of thiosemicarbazones (1a-b)

To obtain the thiosemicarbazones (**1a-b**), 2,3,4-trichloroacetophenone (**1a**) or 2,4-dichloroacetophenone (**1b**) at 1.06 mmol concentration and thiosemicarbazide at 1.06 mmol were dissolved in ethanol (0.1 M) and 0.2% of H₂SO₄ was added as a catalyser. The mixture was subjected to irradiation in the ultrasound bath at room temperature, for about 30 min to 2 h, with further recrystallisation in ethanol.

(*E*)-2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinecarbothioamide (**1a**): M.w.: 296.60 g/mol. Rf: 0.400 in a Hexanes 7:3 Ethyl acetate system. M.p. (°C): 222–225 °C.

(*E*)-2-(1-(2,4-dichlorophenyl)ethylidene)hydrazine-1-carbothioamide (**1b**): M.w.: 262.152 g/mol. Rf: 0.533 in a Hexanes 7:3 Ethyl acetate system. M.p. (°C): 185–189 °C.

4.1.2. General procedure for the synthesis of 1,3-thiazoles (2–17)

Thiosemicarbazones **1a** or **1b** at 1 mmol and the respective alpha-halo acetophenones (1.1 mmol) were dissolved in isopropanol (0.05 M), the mixture was refluxed at 85 °C, with stirring, for about 2–6 h to yield solids. The reactions were then treated for purification via Buchner filtration with cold isopropanol and cold water washes, with recrystallisation in isopropanol or water where necessary.

(*E*)-4-phenyl-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (**2**): M.w.: 396.714 g/mol. Rf: 0.40 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 222°–225 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 7.86 (d, 2H, *J*=8.7Hz, Ar), 7.71 (d, 1H, *J*=8.4Hz Ar), 7.45 (d, 2H, *J*=9Hz), 7.39 (d, 1H, *J*=7.8Hz, Ar), 7.31 (m, 2H, C-H thiazole and Ar), 4.82 (bs, 1H, N-H), 2.31 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): 18.2 (C-H, Ar), 104.25 (C-H, thiazole), 125.52 (C-H, Ar), 127.55 (C-H, Ar), 128.59 (C-H, Ar), 128.97 (C-H, Ar), 129.03 (C-H, Ar), 128.04 (C-H, Ar), 129.27 (C-H, Ar), 132.71 (C-H, Ar), 134.55 (C-H, Ar), 139.70 (C-H, Ar), 146.15 (C-H, Ar), 150.05 (C-H, Ar), 169.25 (S-C=N). NH at approx.

3450 and C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 394.9818, HR-MS (ESI): 393.825 [M – H]⁺.

(*E*)-4-(4-fluorophenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (**3**): M.w.: 414.7044 g/mol Rf: 0.133 in a hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 199–201 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 2.29 (s, 3H, CH₃), 3.42 (bs, 1H, N-H), 7.87–7.92 (m, 2H, Ar), 7.70 (d, 1H, *J*=8.1Hz, Ar), 7.44 (d, 1H, *J*=8.7Hz, Ar), 7.19–7.25 (m, 3H, Ar, C-H₂heterocycle). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): 169.40 (S-C=N), 163.13 (C=N), 149.39 (C-H, heterocycle), 145.32 (C-H, Ar), 139.91 (C-H, Ar), 132.42 (C-H, Ar), 131.48 (C-H, Ar), 129.29 (C-H, Ar), 128.89 (C-H, Ar), 127.52 (C-H, Ar), 127.41 (C-H, Ar), 115.51 (C-H, Ar), 115.24 (C-H, Ar), 103.50 (C-H, thiazole), 18.22 (C-H₃). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450 and C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 412.9723, HR-MS (ESI): 413.538 [M+H]⁺.

(*E*)-4-(4-chlorophenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (**4**): M.w.: 431.1560 g/mol. Rf: 0.433 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 203–206 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 7.88 (d, 2H, C-H Ar, *J*=8.1Hz), 7.71 (d, 2H, C-H Ar, *J*=8.7Hz), 7.67 (s, 1H, C-H thiazole), 7.38–7.52 (m, 2H, C-H Ar), 2.27 (s, 3H, C-H₃), 4.87 (s, 1H, N-H). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): 179.23 (S-C=N), 169.40 (C=N), 149.17, 146.22 (C-F, *J* = 295 Hz), 139.66 (C-H, thiazole), 133.47 (C-H, Ar), 132.77 (C-H, Ar), 131.97 (C-H, Ar), 131.37 (C-H, Ar), 130.80 (C-H, Ar), 129.53 (C-H, Ar), 129.28 (C-H, Ar), 128.99 (C-H, Ar), 128.89 (C-H, Ar), 128.64 (C-H, Ar), 127.27 (C-H, Ar), 105.14 (C-H, thiazole), 18.26 (CH₃). Calculated exact mass: 428.9428, HR-MS (ESI): 427.758 [M – H]⁺.

(*E*)-4-(4-methoxyphenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (**5**): M.w.: 426.74 g/mol. Rf: 0.32 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 176–180 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 11.34 (s, 1H, N-H), 7.8 (d, 2H, *J*=9.3Hz, Ar), 7.72 (d, 1H, *J*=8.4Hz, Ar), 7.45 (d, 1H, *J*=8.4Hz, Ar), 7.13 (s, 1H, C-H thiazole), 6.97 (d, 2H, *J*=8.1Hz, Ar), 3.79 (s, 3H, O-C-H₃), 2.3 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): 129.265 (S-C=N), 128.944 (C-H, thiazole), 126.828 (C-H, Ar), 55.099 (O-C-H₃, Ar), 18.162 (C-H₃). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 424.9923 Da, HR-MS (ESI): 425.255 [M+H]⁺.

(*E*)-4-(4-nitrophenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (**6**): M.w.: 441.711 g/mol. Rf: 0.33 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 233–236 °C. ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): 10.97 (s, 1H, N-H), 8.22–8.30 (m, 2H, Ar), 8.11 (dd, 2H, *J*=8.1Hz, *J*=8.7Hz, Ar), 7.76–7.77 (m, 2H, Ar), 7.42 (dd, 1H, *J*=8.7Hz, *J*=8.4Hz, C-H heterocycle), 2.23 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO-*d*₆): 170.90 (C-H, Ar), 161.90 (C-H, Ar), 157.6 (C-H, Ar), 150.2 (S-C=N), 141.9 (C-H, thiazole), 126.2 (C-H, Ar), 123.99 (C-H, Ar), 122.075 (C-H, Ar), 119.193 (C-H, Ar), 112.066 (C-H, Ar), 109.43 (C-H, Ar), 108.372 (C-H, Ar), 106.20 (C-H, Ar), 99.93 (C-H, thiazole), 16.5 (C-H₃). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 439.9668 Da, HR-MS (ESI): 441.960 [M+2H]⁺.

(*E*)-4-(3,4-dichlorophenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (**7**): M.w.: 465.598 g/mol. Rf: 0.500 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 188–190 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 8.07 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz), 7.82 (dd, *J* = 8.4, 1H, 2.1 Hz), 7.65 (dd, *J* = 17.3, 2H, 8.4 Hz), 7.46–7.42 (m, 2H), 7.41 (s, 1H, C-H thiazole), 2.27 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR (101 MHz, *d*₆) δ 18.22 (C-H₃), 105.97 (C-H, thiazole), 125.51 (C-H, Ar), 127.17 (C-H, Ar), 128.90 (C-H, Ar), 129.29 (C-H, Ar), 129.50 (C-H, Ar), 130.75 (C-H, Ar), 130.82 (C-H, Ar), 131.25 (C-H, Ar), 131.39 (C-H, Ar), 132.47 (C-H, Ar), 135.44 (C-H, Ar), 139.87 (C-H, Ar), 145.52 (C-H, Ar), 147.91 (C-H, Ar), 170.62 (S-C=N). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 462.9038 Da, HR-MS (ESI): 463.716 [M+H]⁺.

(*E*)-4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (**8**): M.w.: 472.812 g/mol. Rf: 0.402 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 186–188 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): 10.43 (s, 1H, N-H), 8.28 (s, 2H, CH₂ heterocycle), 8.17 (s, 2H, Ar), 7.97–7.75 (m, 2H, Ar), 7.73–7.66 (m, 2H, Ar), 7.51–7.37 (m, 2H, Ar), 7.35–7.28 (m, 2H, Ar), 2.50 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR and DEPT

(100 MHz, DMSO- d_6): 179.31 (S-C=N), 169.31 (C-H, thiazole), 154.68 (C-H, Ar), 147.36 (C-H, Ar), 139.71 (C-H, Ar), 139.59 (C-H, Ar), 139.02 (C-H, Ar), 132.84 (C-H, Ar), 131.36 (C-H, Ar), 130.52 (C-H, Ar), 129.48 (C-H, Ar), 129.24 (C-H, Ar), 128.91 (C-H, Ar), 128.83 (C-H, Ar), 127.42 (C-H, Ar), 126.79 (C-H, Ar), 126.41 (C-H, Ar), 126.054 (C-H, Ar), 126.05 (C-H, thiazole), 18.22 (C-H₃). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 471.0131 Da, HR-MS (ESI): 495.9957 [M+Na]⁺.

(E)-4-(naphthalen-1-yl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (9): M.w.: 446.774 g/mol. Rf: 0.367 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 167 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 11.46 (s, 1H, N-H), 8.41 (dd, 1H, J =1.7, 0.8 Hz), 8.01 (dd, 1H, J =8.6, 1.7 Hz), 7.96–7.89 (m, 3H, Ar), 7.71 (d, 1H, J =8.4 Hz), 7.57–7.48 (m, 2H, Ar), 7.47 (s, 1H, Ar), 7.45 (s, 1H, thiazole), 2.33 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO- d_6): 169.30 (S-C=N), 145.99 (C-H, thiazole), 139.68 (C-H, Ar), 133.12 (C-H, Ar), 132.71 (C-H, Ar), 132.39 (C-H, Ar), 132.07 (C-H, Ar), 131.35 (C-H, Ar), 130.77 (C-H, Ar), 129.24 (C-H, Ar), 128.08 (C-H, Ar), 128.07 (C-H, Ar), 127.53 (C-H, Ar), 126.41 (C-H, Ar), 125.97 (C-H, Ar), 124.05 (C-H, Ar), 123.89 (C-H, Ar), 105.04 (C-H, thiazole), 18.19 (C-H₃). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 444.9974 Da, HR-MS (ESI): 443.773 [M – H]⁺.

(E)-4-(2,4-dichlorophenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (10): M.w.: 465.598 g/mol. Rf: 0.54 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 196–198 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 10.03 (s, 1H, N-H), 8.17 (s, 1H), 7.88–7.42 (m, 5H), 7.30 (s, 1H, C-H thiazole), 2.47 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR (101 MHz, d_6) δ 18.33 (C-H₃), 109.35 (C-H, thiazole), 127.51 (C-H, Ar), 128.97 (C-H, Ar), 128.07 (C-H, Ar), 129.35 (C-H, Ar), 129.74 (C-H, Ar), 131.52 (C-H, Ar), 132.29 (C-H, Ar), 132.36 (C-H, Ar), 135.43 (C-H, Ar), 133.47 (C-H, Ar), 140.01 (C-H, Ar), 146.12 (C-H, Ar), 161.91 (C=N, Ar), 169.32 (S-C=N). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 462.9039 Da, HR-MS (ESI): 463.690 [M+H]⁺.

(E)-4-(4-bromophenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (11): M.w.: 475.61 g/mol. Rf: 0.475 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 202 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 7.83 (d, 1H, J =6.3Hz), 7.72 (d, 1H, J =6.3Hz), 7.60 (d, 1H, J =6.3Hz), 7.43 (d, 2H, J =6.6Hz), 7.39 (s, 1H, thiazole), 3.43 (bs, 1H, N-H), 2.30 (s, 3H, C-H₃). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO- d_6): 169.66 (S-C=N), 149.18 (C-H, Ar), 145.69 (C-H, Ar), 139.64 (C-H, Ar), 133.81 (C-H, Ar), 132.52 (C-H, Ar), 131.42 (C-H, Ar), 131.19 (C-H, Ar), 130.64 (C-H, Ar), 129.19 (C-H, Ar), 128.85 (C-H, Ar), 127.43 (C-H, Ar), 120.35 (C-H, thiazole), 104.89 (C-H, thiazole), 18.16 (C-H₃). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 472.8923 Da, HR-MS (ESI): 474.073 [M+2H]⁺.

(E)-4-(3-nitrophenyl)-2-(2-(1-(2,3,4-trichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (12): M.w.: 441.711 g/mol. Rf: 0.300 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 226–228 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): 2.30 (s, 3H, C-H₃), 7.45 (d, 1H, J =8.8Hz), 7.54 (s, 1H, C-H thiazole), 7.70–7.67 (dd, 2H, J =6Hz), 8.13–8.11 (m, 2H, Ar), 8.28 (d, 1H, J =7.6Hz), 8.69 (s, 1H, C-H Ar). ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO- d_6): 18.2 (C-H₃), 106.34 (C-H, thiazole), 119.89 (C-H, Ar), 128.83 (C-H, Ar), 129.23 (C-H, Ar), 130.11 (C-H, Ar), 130.71 (C-H, Ar), 131.21 (C-H, Ar), 131.48 (C-H, Ar), 132.41 (C-H, Ar), 136.41 (C-H, Ar), 136.41 (C-H, Ar), 139.84 (C-H, Ar), 145.42 (C-H, Ar), 148.24 (C-H, thiazole), 170.83 (S-C=N). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 439.9668 Da, HR-MS (ESI): 440.761 [M+H]⁺.

(E)-2-(2-(1-(2,4-dichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)-4-phenylthiazole (13): M.w.: 362.272 g/mol. Rf: 0.55 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 200–203 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.86 (d, 2H, J =7.9 Hz), 7.68 (s, 1H, C-H), 7.49 (s, 1H), 7.41 (t, 2H, J =7.2 Hz), 7.34–7.28 (m, 2H, Ar), 7.28 (s, 1H, C-H thiazole), 6.49 (s, 1H), 2.30 (s, 3H, C-H₃) ppm. ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO- d_6): δ 18.24 (C-H₃), 104.22 (C-H, thiazole), 125.54 (C-H, Ar), 127.49 (C-H,

Ar), 127.56 (C-H, Ar), 128.59 (C-H, Ar), 129.33 (C-H, Ar), 131.69 (C-H, Ar), 132.19 (C-H, Ar), 133.62 (C-H, Ar), 134.48 (C-H, Ar), 137.53 (C-H, Ar), 146.31 (C-H, Ar), 150.10 (C, thiazole), 169.36 (S-C=N). Calculated exact mass: 361.02 07 Da, HR-MS (ESI): 362.018 [M+H]⁺.

(E)-4-(4-chlorophenyl)-2-(2-(1-(2,4-dichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (14): M.w.: 396.714 g/mol. Rf: 0.57 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 158–161 °C.

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 7.87 (d, 2H, J =7.9 Hz), 7.66 (s, 1H, C-H), 7.65 (t, 2H, J =7.2 Hz), 7.57 (s, 1H, C-H), 7.54–7.44 (m, 2H, Ar), 7.28 (s, 1H, C-H thiazole), 2.29 (s, 3H, C-H₃) ppm. ¹³C NMR and DEPT (100 MHz, DMSO- d_6): δ 18.20 (C-H₃), 108.54 (C-H, thiazole), 124.03 (C-H, Ar), 126.21 (C-H, Ar), 127.38 (C-H, Ar), 129.29 (C-H, Ar), 131.65 (C, Ar), 132.07 (C, Ar), 133.32 (C, Ar), 137.67 (C, Ar), 139.91 (C, Ar), 140.92 (C, Ar), 146.01 (C, Ar), 148.47 (C, thiazole), 171.50 (S-C=N). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 394.9818 Da, HR-MS (ESI): 395.808 [M+H]⁺.

(E)-2-(2-(1-(2,4-dichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)-4-(4-methoxyphenyl)thiazole (15): M.w.: 392.2980 g/mol. Rf: 0.78 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 130 °C. ¹H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 11.28 (s, 1H, bs, N-H), 7.86–7.75 (m, 2H, Ar), 7.68 (d, 1H, J =1.8 Hz), 7.54–7.41 (m, 2H, Ar), 7.12 (s, 1H, C-H thiazole), 6.97 (d, 2H, J =8.9 Hz), 3.78 (s, 3H, O-C-H₃), 2.30 (s, 3H, C-H₃) ppm. ¹³C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 18.16 (C-H₃), 55.09 (O-C-H₃), 102.05 (C-H, thiazole), 113.93 (C-H, Ar), 126.82 (C-H, Ar), 127.46 (C-H, Ar), 129.30 (C-H, Ar), 131.67 (C-H, Ar), 132.18 (C, Ar), 133.55 (C, Ar), 137.59 (C, Ar), 145.80 (C, Ar), 150.45 (C=N), 158.75 (C-O), 169.21 (S-C=N). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 391.0313 Da, HR-MS (ESI): 389.90 [M – 2H]⁺.

(E)-4-(3,4-dichlorophenyl)-2-(2-(1-(2,4-dichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (16): M.w.: 431.15 g/mol. Rf: 0.457 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 216 °C. ¹H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 8.27 (d, 2H, J =8.4 Hz), 8.11 (d, 2H, J =8.4 Hz), 7.78–7.63 (m, 3H, Ar), 7.55 (d, 1H, J =8.3 Hz), 7.51–7.31 (m, 4H, Ar), 7.48 (s, 1H, C-H thiazole), 3.88 (bs, 1H, N-H), 2.29 (s, 3H, C-H₃) ppm. ¹³C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 18.26 (C-H₃), 108.71 (C-H, thiazole), 123.43 (C-H, Ar), 124.10 (C-H, Ar), 126.29 (C-H, Ar), 127.47 (C-H, Ar), 129.35 (C-H, Ar), 131.71 (C-H, Ar), 132.15 (C-H, Ar), 133.46 (C, Ar), 137.65 (C, Ar), 140.91 (C, Ar), 145.95 (C, Ar), 146.11 (C, Ar), 148.53 (C=N), 170.74 (S-C=N). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 428.9428 Da, HR-MS (ESI): 428.216 [M – H]⁺.

(E)-4-([1,1'-biphenyl]-4-yl)-2-(2-(1-(2,4-dichlorophenyl)ethylidene)hydrazinyl)thiazole (17): M.w.: 438.37 g/mol. Rf: 0.517 in a Hexanes 7:3 ethyl acetate system. M.p. (°C): 143 °C. ¹H NMR(DMSO- d_6 , 400 MHz): δ = 7.96 (d, 2H, J =8.4 Hz), 7.88 (d, 2H, J =8.4 Hz), 7.78–7.63 (m, 3H, Ar), 7.55 (d, 1H, J =8.3 Hz), 7.51–7.31 (m, 4H, Ar), 7.15 (s, 1H, C-H thiazole), 3.40 (bs, 1H, N-H), 2.31 (s, 3H, C-H₃) ppm. ¹³C NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz) δ 18.24 (C-H₃), 110.72 (C-H, thiazole), 125.95 (C-H, Ar), 126.08 (C-H, Ar), 126.42 (C-H, Ar), 126.80 (C-H, Ar), 127.36 (C-H, Ar), 127.47 (C-H, Ar), 128.92 (C-H, Ar), 129.16 (C-H, Ar), 129.32 (C-H, Ar), 131.68 (C, Ar), 131.97 (C, Ar), 132.18 (C, Ar), 133.82 (C, Ar), 133.85 (C, Ar), 137.54 (C, Ar), 139.63 (C, Ar), 147.63 (C=N), 168.22 (S-C=N). FTIR (ATR – Ge): NH at approx. 3450, C=N at approx. 1620–1680. Calculated exact mass: 437.0520 Da, HR-MS (ESI): 458.0205 [M+Na]⁺.

4.2. Cytotoxicity studies

RAW 264.7 macrophage cell line was cultured in DMEM medium (Cultilab, Sao Paulo, Brazil) containing 10% heat-inactivated foetal bovine serum (FBS) (Cultilab, Sao Paulo, Brazil), 100U/mL penicillin G, and in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air at 37°C. Culture medium was changed 2–3 days and subcultured when cell population density reached to 70–80% confluence. *T. cruzi* Dm28c epimastigotes (10⁶ parasites/ml), cloned derived from Dm28 strain, were maintained at 27 °C in LIT (Liver Infusion Tryptose) medium supplemented with

10% FBS, 1% hemin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), and mg/mL penicillin-streptomycin ((Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Y strain trypanomastigotes (10^7 parasites) were obtained from the supernatant of infected VERO cells and were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) supplemented with 10% FBS, and 50 mg/mL gentamycin at 37°C and 5% CO₂. After cell population density confluence in culture, the trypanomastigote form were separated by centrifugation.

4.2.1. Cytotoxicity in RAW 264.7 macrophages

MTT-tetrazolium reduction assay was used to evaluate effects of compounds against RAW 264.7 cells. Briefly, 1×10^5 cells/well were added in 96-well plates and incubated for 24 h (37 °C and 5% CO₂). Compounds were then added in different concentrations (1–100 mg/mL) and incubated for 72 h. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide, 5 mg/mL in PBS) was added to each well and incubated again for 2 h and 37 °C. Culture medium and MTT not reduced was removed and 100 mL of DMSO were added. The amount of formazan was determined by measuring the absorbance at 595 nm equipment. Concentration leading to 50% inhibition of viability (CC₅₀) was calculated by regression analysis with GraphPad Prism Software, version 5.0.

4.2.2. Trypanocidal activity evaluated against epimastigote form

Epimastigotes were distributed into a 96 well plate to a final density of 10^6 cells per well. Each compound was dissolved in the respective wells, in triplicate. Benznidazole was used as positive control in this assay. Cells were then cultivated for 96 h at 27°C. After this time, cell aliquots from each well were collected, and the number of parasites was calculated in a Neubauer chamber. Epimastigotes not treated with compounds (negative control) were assumed as 100% of the number of parasites. Dose-response curves were determined, and the IC₅₀ values were calculated using at least five concentrations and a nonlinear regression (GraphPad Prism, version 5.0).

4.2.3. Trypanocidal activity evaluated against trypomastigote form

Trypomastigotes were collected from VERO cells supernatants and distributed in a 96 well plate to a final density of 4×10^5 cells per well. Each compound was added to the wells, in triplicate. Benznidazole was used as positive controls in this assay. Plate was then cultivated for 24 h at 37 °C and 5% CO₂. After this time, aliquots from each well were collected, and the number of viable parasites (i.e., with apparent motility) was counted in a Neubauer chamber. Wells that did not receive compound were assumed as 100% of viable parasites. Dose-response curves were determined, and the IC₅₀ values were calculated by nonlinear regression (Prism, version 5.0) using at least seven concentrations.

4.2.4. Trypanocidal activity evaluated against amastigotes form

The trypanomastigote forms (Tulahuen strain) were obtained from the *in vitro* infection of the L929 cell line, after cell population density in culture. Amastigote form, L929 cells were cultivated in plates straight bottom and incubated for 24 at 37 °C. Parasites were added and after 3 h of interaction, the non-internalized parasites were removed and the plates incubated for 48 h to consolidate the infection. The compounds were dissolved in different concentrations (0.6–20 µg/ml), and the plates incubated again for 96 h. Only culture medium was used as a negative control and BDZ as a positive control. The end of the incubation, the CPRG solution (Chlorophenol red-B-D-galactopyranoside, 500 µM, 0.5% Nonidet P-40, in PBS) was added, followed by a further incubation for 18 h at 37 °C. The absorbance was read at 570 nm on the THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC spectrophotometer. IC₅₀ values were calculated by regression analysis using GraphPad Prism software. The experiment was done in triplicate.

4.3. Molecular docking on cruzain

The tridimensional structure of each compound, including their respective E and Z isomers, has been built using the SPARTAN 08' program [37] and the optimization was carried out using the RM1 [38] method, using internal default settings for convergence criteria. Docking analysis was carried out using the *T. cruzi* cruzain as target (PDB: 3IUT, rcsb.org), and the binding site was defined as all atoms within a radius of 6.0 Å from the co-crystallized ligand (KB2). The GOLD 5.2 program [39] was applied for docking calculations, using the default score function (ChemPLP). To take into consideration the degrees of freedom for the receptor for better simulation of the induced fit, the following amino acid residues were treated as flexible during the calculations, using conformation library: CYS25, TRP26, ASP60, SER64, LEU67, MET68, ASN70, MET160, ASP161 e LYS162. Then, the BINANA 1.2 program [40] was used to analyse the molecular interactions found at the ligand-target complexes obtained as docking results, using default settings. The figures were generated using the PyMOL 1.3 program [41]. All hydrogen bond distances were measured between donor and acceptor atoms. Although the intermolecular interactions have been mapped for all isomers of all molecules, the E isomers have been considered during the binding mode analysis discussion.

4.4. Flow cytometry analysis

4.4.1. Apoptosis – annexin V-7AAD assay

Trypomastigotes (4×10^5 cells/mL) were resuspended in RPMI-1640 medium and treated with compounds 3, 7, 10, 15 and 17, (0.25 and 1.1 µM) for 24 h at 37 °C with 5% CO₂. Parasites were labelled with 7AAD and annexin V using the annexin V-FITC apoptosis detection kit (Ebioscience, San Diego, USA) according to the manufacturer's instructions. The experiment was performed using a BD Calibur flow cytometer (San Jose, USA) by acquiring at least 50,000 events. Data were analysed using the FlowJo software (Tree Star, Inc., San Carlos, USA). Two independent experiments were performed in duplicate each.

4.4.2. DNA damage (acridine orange assay) and mitochondria damage - rhodamine assay

Trypomastigotes (4×10^6 cells/mL) were resuspended in RPMI-1640 medium and treated with compounds 3, 7, 10, 15 and 17, (0.25 and 1.1 µM) for 24 h at 37 °C with 5% CO₂. Treated and non-treated cells were washed and resuspended in 0.5 mL of PBS (pH 7.2–7.4) with 10 µg/mL of Rhodamine 123 (Rho 123, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) or 10 µg/mL of acridine orange (AO, Sigma-Aldrich, St Louis, USA) for 20 min. After this period, parasite cells were washed with PBS and immediately analysed by flow cytometry in which the fluorescence intensity of AO and Rho 123 were quantified. Saponin (0.1%) treated cells were used as internal positive control. 20,000 events were acquired in the flow cytometer and the changes in the intensity of fluorescence for the Rho 123 or for the AO were measured by the variation index (VI) calculated by the equation: $VI = (MT - MC)/MC$, where MT is the median of fluorescence for treated parasites and MC is the median of fluorescence for non-treated parasites and stained.

4.5. In silico prediction of physicochemical and pharmacokinetics parameters

The pharmacokinetic prediction of the compounds was performed using the free online platform SWISSADME® (www.swissadme.ch). Insertion of the planar structures of the molecules and conversion of the data into SMILES for automatic generation of multiparameter readouts was performed [42].

Funding statement

PROEP/IAM Faixa B (Process VPPCB-008-FIO-18-2-85) to VRAP.

CNPQ scholarship (127938/2016-8) to MCHBD during the execution of the practical work reported here.

Author contributions

MCHBD conducted the structural planning, chemical synthesis, isolation, and *in silico* ADMET prediction and characterisation studies under the supervision of ACLL. MSB conducted *in vitro* biological studies, under the supervision of VRAP. GBOF and MVOC contributed towards compounds' rational planning and design and spectral data interpretation, under the supervision of ACLL. LFGRF executed the *in silico* docking studies under the supervision of MZH. ACSS, ACCS and MCABC contributed with *in vitro* biological studies. VRAP and RFS were responsible for interpretation of biological data. MCHBD, VRAP and RFS were involved in drafting the manuscript, and DMNM was involved in reviewing the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Data availability

Data will be made available on request.

Acknowledgements

This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE). Ana Cristina Lima Leite is receiving a CNPQ senior fellowship. Authors are thankful to the Departamento de Química Fundamental (DQF-UFPE) for recording the ^1H NMR and ^{13}C NMR spectra of compounds.


Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115508>.

References

- WHO, W.H.O. Chagas Disease (Also Known as American Trypanosomiasis), 2022, 13th April 2022 [cited 2023 1st January 2023]; Available from: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- K.C.F. Lidani, et al., Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem, *Front. Public Health* 7 (2019) 166.
- F. Guhl, J.D. Ramirez, Poverty, migration, and chagas disease, *Current Tropical Medicine Reports* 8 (1) (2021) 52–58.
- J.R. Cançado, Criteria of Chagas Disease Cure, vol. 94, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1999, pp. 331–335.
- Exeltis, Benznidazole Tablets Treatment Information, 2019, 8th April 2023], <http://www.benznidazoletablets.com/en/>.
- A.C.C. Silva, et al., Chagas disease treatment and rational drug discovery: a challenge that remains, *Front. Pharmacol.* 10 (2019) 873.
- J.M. Kratz, et al., The translational challenge in Chagas disease drug development, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 117 (2022), e200501.
- VG de Melo Silva, JM da Conceição, CC Vieira Costa Silva, AC Leal, DL Araújo, JS Nunes, ETN da Silva, AJFS da Silva, MCH de Barros Dias, AC Lima Leite, Outlining the molecules tested in vivo for Chagas disease, Malaria, and Schistosomiasis over the last six years - a literature review focused on new synthetic drug identities and repurposing strategies, *Curr. Med. Chem.* (2022 Sep 30), <https://doi.org/10.2174/0929867329666220930112136>. Epub ahead of print. PMID: 36200257.
- D.f.n.d.i. Dndi, DNDI-6148 Research Development, 2022, 15th February 2023 [cited 2023 27th March 2023], <https://dndi.org/research-development/p-ortfolio/dndi-6148/>.
- M.E. McGrath, et al., The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease, *J. Mol. Biol.* 247 (2) (1995) 251–259.
- A.C.L. Leite, et al., Synthesis, cruzain docking, and in vitro studies of aryl-4-oxothiazolylhydrazones against trypanosoma cruzi, *ChemMedChem: Chemistry Enabling Drug Discovery* 2 (9) (2007) 1339–1345.
- A.C.L. Leite, et al., Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (11) (2006) 3749–3757.
- M.Z. Hernandez, et al., Studies toward the structural optimization of novel thiazolylhydrazone-based potent antitrypanosomal agents, *Bioorg. Med. Chem.* 18 (22) (2010) 7826–7835.
- P.A. Teixeira de Moraes Gomes, et al., Dual parasitocidal activities of phthalimides: synthesis and biological profile against trypanosoma cruzi and plasmodium falciparum, *ChemMedChem* 15 (22) (2020) 2164–2175.
- M.V. de Oliveira Cardoso, et al., 2-(phenylthio) ethylidene derivatives as anti-Trypanosoma cruzi compounds: structural design, synthesis and antiparasitic activity, *Eur. J. Med. Chem.* 180 (2019) 191–203.
- L. de Siqueira, et al., Synthesis and anti-Trypanosoma cruzi profile of the novel 4-thiazolidinone and 1, 3-thiazole derivatives, *Frontiers* 2 (2019) 1–12.
- E.B. da Silva, et al., Design and synthesis of potent anti-Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death, *Eur. J. Med. Chem.* 130 (2017) 39–50.
- P.A.T. de Moraes Gomes, et al., Phthalimido-thiazoles as building blocks and their effects on the growth and morphology of Trypanosoma cruzi, *Eur. J. Med. Chem.* 111 (2016) 46–57.
- M.V. de Oliveira Cardoso, 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.
- D.R.M. Moreira, 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 (24) (2012) 10918–10936.
- G.B. de Oliveira Filho, et al., Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of 4-thiazolidinones against Trypanosoma cruzi, *Bioorg. Med. Chem.* 23 (23) (2015) 7478–7486.
- D.L.N. Gonzalez, et al., Antiprotozoal QSAR modelling for trypanosomiasis (Chagas disease) based on thiosemicarbazone and thiazole derivatives, *J. Mol. Graph. Model.* 103 (2021), 107821.
- A. Kryshchysyn, et al., Thiazolidinone/thiazole based hybrids-New class of antitrypanosomal agents, *Eur. J. Med. Chem.* 174 (2019) 292–308.
- M. Haroon, et al., The design, synthesis, and in vitro trypanocidal and leishmanicidal activities of 1, 3-thiazole and 4-thiazolidinone ester derivatives, *RSC Adv.* 11 (4) (2021) 2487–2500.
- A. Singh, et al., Thiazole derivatives in medicinal chemistry: recent advancements in synthetic strategies, structure activity relationship and pharmacological outcomes, *J. Mol. Struct.* 1266 (2022), 133479.
- A.C.L. Leite, et al., Privileged structures in the design of potential drug candidates for neglected diseases, *Curr. Med. Chem.* 26 (23) (2019) 4323–4354.
- G.B. de Oliveira Filho, et al., Structural design, synthesis and pharmacological evaluation of thiazoles against Trypanosoma cruzi, *Eur. J. Med. Chem.* 141 (2017) 346–361.
- P.A.T. de Moraes Gomes, et al., New 1, 3-thiazole derivatives and their biological and ultrastructural effects on Trypanosoma cruzi, *Eur. J. Med. Chem.* 121 (2016) 387–398.
- G.B. de Oliveira Filho, et al., Structural design, synthesis and anti-Trypanosoma cruzi profile of the second generation of 4-thiazolidinones chlorine derivatives, *Chem. Biol. Interact.* 345 (2021), 109514.
- A. Hantzsch, J. Weber, Ueber verbindungen des thiazols (pyridins der thiophenreihe), *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 20 (2) (1887) 3118–3132.
- A.C.L. Leite, et al., Synthesis, docking, and in vitro activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiosemicarbazides and acyl-thiazolidones against Trypanosoma cruzi, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (11) (2006) 3749–3757.
- D.R.M. Moreira, et al., Structural design, synthesis and structure-activity relationships of thiazolidinones with enhanced anti-trypanosoma cruzi activity, *ChemMedChem* 9 (1) (2014) 177–188.
- V.C. Santos, et al., The gene repertoire of the main cysteine protease of Trypanosoma cruzi, cruzipain, reveals four sub-types with distinct active sites, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021), 18231.
- A.L. Mazzetti, et al., Review on experimental treatment strategies against trypanosoma cruzi, *J. Exp. Pharmacol.* 13 (2021) 409–432.
- V. Kourbeli, et al., An overview on target-based drug design against kinetoplastid Protozoan infections: human african trypanosomiasis, chagas disease and leishmaniasis, *Molecules* 26 (15) (2021).
- I. Beltran-Hortelano, et al., Examination of multiple Trypanosoma cruzi targets in a new drug discovery approach for Chagas disease, *Bioorg. Med. Chem.* 58 (2022), 116577.
- Wavefunction, Spartan '08 Tutorial and User's Guide, 2022. Available from, <http://www.wavefun.com/products/spartan.html>.
- G.B. Rocha, et al., Rm1: a reparameterization of am1 for h, c, n, o, p, s, f, cl, br, and i, *J. Comput. Chem.* 27 (10) (2006) 1101–1111.
- C.C.D. Centre, Gold software, Available from, <http://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/csd-discovery/components/gold>, 2022.
- J.D. Durrant, J.A. McCammon, BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization, *J. Mol. Graph. Model.* 29 (6) (2011) 888–893.
- D. Scientific, The PyMOL Molecular Graphics System, 2022.
- A. Daina, O. Michielin, V. Zoete, SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules, *Sci. Rep.* 7 (1) (2017) 1–13.

ANEXO B - CEUA 102/2016

 **Fundação Oswaldo Cruz**
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

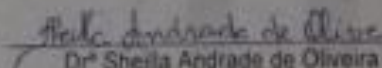
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: "AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA" protocolado sob nº 102/2016 pelo (a) pesquisador (a) Dra Valéria Pereira **Hernandes** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 10/02/2017. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 10 de fevereiro de 2021 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Especie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo isogênico (BALB/c)	375 (20-30 gr/ 60 dias/ machos)
TOTAL	375

We certify that project "AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE ANTI-PARASITÁRIA, ANTITUMORAL E IMUNOMODULADORA DE COMPOSTOS NATURAIS OU OBTIDOS POR SÍNTESE ORGÂNICA" (CEUA Protocol nº 102/2016) coordinated by **VALÉRIA PEREIRA HERNANDES** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on february, 10, 2017. In present version this project is licensed and valid until february 2021 for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) February, 10, 2017


D^{ra} Sheila Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

D^{ra} Sheila Andrade de Oliveira
 Coordenadora do Conselho de Ética
 no Uso de Animais - CEUA
 Tel: 51APE 3554875
 e-mail: sheila@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM/Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária - Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP 512-030
 Telefone: (81) 3101-3500/3101-3880 Fax: (81) 3452-1044
 www.cpqam.fiocruz.br