

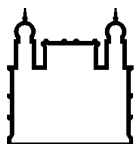
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**Otimização e atividade biológica de derivados de pirazol sobre
Trypanosoma cruzi: análise computacional, ensaios de
reversibilidade e modelo de cultivo 3D como potenciais ferramentas
preditivas de eficácia.**

LORRAINE MARTINS ROCHA ORLANDO

Rio de Janeiro
Julho/ 2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LORRAINE MARTINS ROCHA ORLANDO

OTIMIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE PIRAZOL SOBRE
TRYPANOSOMA CRUZI: ANÁLISE COMPUTACIONAL, ENSAIOS DE
REVERSIBILIDADE E MODELO DE CULTIVO 3D COMO POTENCIAIS
FERRAMENTAS PREDITIVAS DE EFICÁCIA

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de mestre em Ciências (Biologia Parasitária)

Orientadora: Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira

Dr. Guilherme Curty Lechuga

RIO DE JANEIRO

Julho de 2021

Orlando, Lorraine Martins Rocha .

Otimização e atividade biológica de derivados de pirazol sobre *Trypanosoma cruzi*: análise computacional, ensaios de reversibilidade e modelo de cultivo 3D como potenciais ferramentas preditivas de eficácia. / Lorraine Martins Rocha Orlando. - Rio de Janeiro, 2021.

96 f.; il.

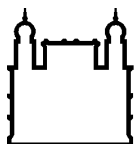
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2021.

Orientadora: Mirian Claudia de Souza Pereira.

Co-orientador: Guilherme Curty Lechuga.

Bibliografia: f. 86-96

1. *Trypanosoma cruzi* . 2. Pirazol. 3. 3D. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

LORRAINE MARTINS ROCHA ORLANDO

OTIMIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE PIRAZOL SOBRE
TRYPANOSOMA CRUZI: ANÁLISE COMPUTACIONAL, ENSAIOS DE
REVERSIBILIDADE E MODELO DE CULTIVO 3D COMO POTENCIAIS
FERRAMENTAS PREDITIVAS DE EFICÁCIA

ORIENTADORES: Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira

Dr. Guilherme Curty Lechuga

Aprovada em: __09__ / __07__ / __2021__

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Carlos Roberto Alves (IOC)

Prof. Dra. Kátia Kalabrese (IOC)

Prof. Dr. Saulo Cabral Bourguignon (UFF)

Prof. Dra. Emilie Barrias (INMETRO)

Prof. Dra. Kelly Salomão (IOC)

Rio de Janeiro, 09 de julho de 2021



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado acadêmico em Biologia Parasitária de **Lorraine Martins Rocha Orlando**, sob orientação da Dr^a. Mirian Claudia de Souza Pereira e coorientada pelo Dr. Guilherme Curtly Lechuga. Ao nono dia do mês de julho de dois mil vinte e um, realizou-se às treze horas, de forma síncrona remota, o exame da dissertação de mestrado acadêmico intitulada: **"Otimização e atividade biológica de derivados de pirazol sobre Trypanosoma cruzi: análise computacional, ensaio de reversibilidade e modelo de cultivo 3D como potenciais ferramentas preditivas de eficácia"**, no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: Biologia, na linha de pesquisa: Biologia Celular e Ultra-Estrutura de Parasita, Vetores e Hospedeiros.. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Carlos Roberto Alves – IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr^a. Karla da Silva Calabrese– IOC/FIOCRUZ, Dr. Saulo Cabral Bourguignon – UFF/RJ, e como suplentes: Dr^a. Emílie Barrias- INMETRO/RJ e Dr^a. Kelly Salomão Salem - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela *Aprovação* da defesa da dissertação de mestrado acadêmico. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Presidente da Banca atesta a decisão e a participação da aluna e de todos os membros da banca de forma síncrona remota. O Coordenador Adjunto do Programa Dr. André Luiz Rodrigues Roque, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 9 de julho de 2021.

Dr. Carlos Roberto Alves (Presidente da Banca):

Dr. André Luiz Rodrigues Roque (Coordenador Adjunto do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360

Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocpsisino

Dedico este trabalho à minha família e ao meu marido, por todo apoio e por sempre estarem ao meu lado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo apoio, incentivo e amor. Principalmente aos meus pais, Angelo Orlando e Vera Regina Martins, minha avó Elena Orlando e minha irmã Sophia Martins. Agradeço também ao meu namorado Wesley Napoleão, por estar presente em todos os momentos. E as minhas amigas Rayane Coutinho e Maryana Moura, por acreditarem em mim, durante todos esses anos.

À minha orientadora Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira, por toda dedicação, apoio e paciência. Agradeço muito por todos os ensinamentos e pela confiança.

Ao meu orientador Guilherme Lechuga e ao Leonardo Lara por todo conhecimento transmitido, pela parceria e ajuda para desenvolver este projeto.

À toda equipe do Laboratório de Ultraestrutura Celular. Aos pesquisadores Tatiana Galvão e Victor Midlej. Aos técnicos Alanderson Nogueira, Liliane Mesquita, Dayse Neto e Renata, por sempre auxiliarem nas tarefas essenciais do laboratório. E aos alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado, por todo carinho e companheirismo.

Aos meus colegas da pós-graduação, em especial Amanda Tucci e Yago Emiliano, por toda amizade dentro e fora da Fiocruz, por tornarem a rotina de bancada e aulas, mais leve e por todos os conselhos.

Ao Prof. Dr. Maurício dos Santos por todos os compostos cedidos e pelo tempo disponibilizado.

Às plataformas de Bioensaios e Triagem de Fármacos e Citometria de Fluxo.

À Capes e ao CNPq pelo auxílio financeiro e bolsa de estudos concedida.

À banca examinadora pela gentileza em aceitar o convite e a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a conclusão deste trabalho.

“O sucesso não tem a ver com quanto dinheiro você ganha, mas com a diferença que você faz na vida de outras pessoas.”

Michelle Obama

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

OTIMIZAÇÃO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE DERIVADOS DE PIRAZOL SOBRE *TRYPANOSOMA CRUZI*: ANÁLISE COMPUTACIONAL E MODELO DE CULTIVO 3D COMO POTENCIAIS FERRAMENTAS PREDITIVAS DE EFICÁCIA

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Lorraine Martins Rocha Orlando

A doença de Chagas é uma doença negligenciada que acomete 6-7 milhões de indivíduos no mundo, com a estimativa de 1,2 a 4 milhões de indivíduos infectados no Brasil. Esta doença centenária causa elevada morbidade e mortalidade, alcançando 10.000 mortes ao ano no mundo. Os fármacos utilizados na clínica, benzonidazol (BZ) e nifurtimox, possuem importantes limitações incluindo eficácia parcial na fase aguda (60-80%) e baixa eficiência na fase crônica, efeitos adversos graves, contraindicação para gestantes e portadores de insuficiência renal e hepática e ainda, como constatado para o BZ, incapaz de prevenir a cardiomiopatia chagásica e eliminar amastigotas dormentes na fase crônica da doença. Assim, a descoberta de novos fármacos efetivos e seguros é essencial para o manejo desta doença silenciosa. Neste estudo, cinco séries de derivados de pirazol, pirazol-carboxamida (séries **1(a-l)** e **2(a-l)**) e pirazol-imidazolina (**3(a-n)**, **4(a-c)** e **5(a-c)**) foram elaboradas com base no composto hit, que possui cruzipaina como alvo, visando otimizar a atividade contra *Trypanosoma cruzi*. As análises *in silico* de propriedades físico-químicas, utilizando o programa Datawarrior e SwissADME, revelaram um perfil de boa biodisponibilidade oral e ausência de promiscuidade dos derivados de pirazol, sem violação da regra de Lipinski e sem alerta de PAINS. Os derivados de pirazol não apresentaram citotoxicidade, alcançando valores de $CC_{50} > 160 \mu\text{M}$. Ensaios de triagem fenotípica foram realizados contra formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (clone Dm28c-luciferase) a fim de avaliar a atividade tripanocida dos derivados de pirazol *in vitro*. Os resultados revelaram que, em geral, os derivados de pirazol sintetizados possuem baixa atividade contra tripomastigotas ($IC_{50} > 34 \mu\text{M}$), mas três análogos de pirazol-imidazolina (**3g**, **3j** e **3m**) apresentaram atividade contra amastigotas intracelulares similar ao BZ ($IC_{50} = 4,67 \pm 0,22$), alcançando valores de IC_{50} entre 2,75 e 6,09 μM e índice de seletividade maior que 40. A análise da relação de estrutura-atividade revelou que a introdução de substituintes, como Cl, Br e metil, na posição *meta* do anel benzeno acarreta aumento da potência dos compostos, com os derivados **3j** ($pIC_{50} = 5,56$) e **3m** ($pIC_{50} = 5,45$) apresentando maior potência que o Bz ($pIC_{50} = 5,33$). Além disso, a posição *orto* do anel benzeno parece ser um domínio subótimo para substituições. Ainda, o efeito reversível da infecção foi avaliado para os análogos **3g**, **3j** e **3m**. Nesta abordagem, os compostos foram removidos após 72h de tratamento das culturas de células VERO infectadas e o perfil de infecção avaliado por luminescência nas 72h subsequentes. Todos os derivados induziram redução significativa na carga parasitária, mas somente o composto **3m** teve eficácia similar ao BZ (100 μM), sem recrudescência do parasitismo na concentração de 2 vezes o valor de IC_{90} (50 μM). A atividade dos derivados **3g**, **3j** e **3m** também foi avaliada no modelo 3D de células VERO, mimetizando a organização tridimensional e fisiologia dos tecidos. Todos os análogos avaliados acarretaram redução significativa na carga parasitária, destacando-se o análogo **3m**, que apresentou efeito similar ao BZ, com evidente redução do parasitismo no microtecido. A predição das propriedades ADMET demonstra que os compostos promissores apresentam boa absorção, são inibidores de CYP1A2 e substrato de CYP3A4 e glicoproteína P, não são mutagênicos ou carcinogênicos, mas apresentam hepatotoxicidade e inibição de hERG, sugerindo a possibilidade de alteração na condução elétrica do miocárdio. Por fim, as análises de atividade de enzimática, utilizando substrato fluorogênico, demonstraram que os análogos **3g**, **3j** e **3m** não são potentes inibidores de cisteína protease, com valor máximo de 45% de inibição desta enzima. Em conjunto, os dados reforçam o potencial tripanocida do híbrido pirazol-imidazolina, cujas mudanças estruturais beneficiaram a atividade contra amastigotas intracelulares em modelos 2D e 3D, sugestivo de boa permeabilidade e absorção pelos tecidos e ainda, demonstraram atividade tripanocida sustentável, sem reativação da infecção *in vitro*. Novas propostas de otimização serão elaboradas a fim de potencializar a atividade tripanocida e avançar para ensaios pré-clínicos *in vivo*, contribuindo para a identificação de compostos com potencial de prosseguir em ensaios clínicos para terapia da doença de Chagas.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

OPTIMIZATION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF PIRAZOLE DERIVATIVES ON *TRYPANOSOMA CRUZI*: COMPUTATIONAL ANALYSIS AND 3D CULTURE MODEL AS POTENTIAL PREDICTIVE TOOLS OF EFFECTIVENESS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITE BIOLOGY

Lorraine Martins Rocha Orlando

Chagas disease is a neglected disease that affects 6-7 million individuals worldwide, with an estimated 1.2 to 4 million infected individuals in Brazil. This century-old disease causes high morbidity and mortality, reaching 10,000 deaths per year worldwide. The drugs used in the clinic, benznidazole (BZ) and nifurtimox, have important limitations including partial efficacy in the acute phase (60-80%) and low efficiency in the chronic phase, serious adverse effects, contraindication for pregnant women and patients with renal and liver failure and yet, as observed for BZ, unable to prevent Chagas cardiomyopathy and eliminate dormant amastigotes in the chronic phase of the disease. Thus, the discovery of new effective and safe drugs is essential for the management of this silent disease. In this study, five series of pyrazole, pyrazole-carboxamide (series **1(a-l)** and **2(a-l)**) and pyrazole-imidazoline (**3(a-n)**, **4(a-c)** and **5(a-c)**) derivatives were elaborated based on the hit compound, which has cruzipain as a target, aiming to optimize the activity against *Trypanosoma cruzi*. *In silico* analyzes of physicochemical properties, using the Datawarrior and SwissADME software, revealed a profile of good oral bioavailability and absence of promiscuity of pyrazole derivatives, without violating Lipinski's rule and without PAINS alert. Pyrazol derivatives did not show cytotoxicity, reaching values of CC50 > 160 μ M. Phenotypic screening assays were performed against trypomastigote and intracellular amastigote forms of *T. cruzi* (Dm28c-luciferase clone) to evaluate the trypanocidal activity of pyrazole derivatives *in vitro*. The results revealed that, in general, the synthesized pyrazole derivatives have low activity against trypomastigotes (IC₅₀ > 34 μ M), but three pyrazol-imidazoline analogues (**3g**, **3j** and **3m**) showed activity against intracellular amastigotes similar to BZ (IC₅₀ = 4.67 \pm 0.22), reaching IC₅₀ values between 2.75 and 6.09 μ M and selectivity index greater than 40. The analysis of the structure-activity relationship revealed that the introduction of substituents, such as Cl, Br and methyl, in the *meta* position of the benzene ring increases the potency of the compounds, with the derivatives **3j** (pIC₅₀=5.56) and **3m** (pIC₅₀=5.45) showing greater potency than BZ (pIC₅₀=5.33). Furthermore, the *ortho* position of the benzene ring appears to be a suboptimal domain for substitutions. Furthermore, the reversible effect of the infection was evaluated for analogues **3g**, **3j** and **3m**. In this approach, compounds were removed after 72h of treatment from infected VERO cell cultures and the infection profile assessed by luminescence in the subsequent 72h. All derivatives induced significant reduction in parasite load, but only compound **3m** had similar efficacy to BZ (100 μ M), without recrudescence of parasitism at a concentration of 2-fold the IC₉₀ value (50 μ M). The activity of **3g**, **3j** and **3m** derivatives was also evaluated in the 3D model of VERO cells, mimicking the three-dimensional organization and physiology of tissues. All the analogues evaluated caused a significant reduction in the parasite load, highlighting the **3m** analogue, which showed a similar effect to BZ, with an evident reduction in parasitism in the microtissue. The prediction of ADMET properties demonstrates that the promising compounds have good absorption, are inhibitors of CYP1A2 and substrate of CYP3A4 and P-glycoprotein, are not mutagenic or carcinogenic, but present hepatotoxicity and hERG inhibition, suggesting the possibility of alteration in electrical conduction of the myocardium. Finally, the enzymatic activity analysis, using a fluorogenic substrate, demonstrated that the analogues **3g**, **3j** and **3m** are not potent cysteine protease inhibitors, with a maximum value of 45% inhibition of this enzyme. Together, the data reinforce the trypanocidal potential of the pyrazol-imidazoline hybrid, whose structural changes benefited the activity against intracellular amastigotes in 2D and 3D models, suggestive of good tissue permeability and absorption, and demonstrated sustainable trypanocidal activity, without reactivation of the parasitism *in vitro*. New optimization proposals will be developed to enhance the trypanocidal activity and advance to pre-clinical *in vivo* trials, contributing to the identification of compounds with potential to continue in clinical trials for the therapy of Chagas disease.

ÍNDICE

RESUMO	VIII
ABSTRACT	IX
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Doença de Chagas	1
1.1.1 A descoberta: breve histórico.....	1
1.1.2 Aspectos epidemiológicos	1
1.1.3. Agente etiológico.....	5
1.1.3.1. Ciclo biológico.....	8
1.1.3.2. Modo de transmissão.....	10
1.1.4. Evolução clínica.....	12
1.1.5. Tratamento clínico.....	13
1.1.6. Inibidores de cruzipaína: um potencial terapêutico.....	16
1.1.7. Pirazol.....	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Objetivo geral.....	23
3.2. Objetivos específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Reagentes.....	24
4.2. Compostos sintéticos.....	24
4.3. Cultivo celular.....	27
4.3.1. Modelo bidimensional (2D)	27
4.3.1.1. Células VERO.....	27
4.3.2. Modelo tridimensional (3D)	28
4.4. Parasitos.....	28
4.5. Ensaio de citotoxicidade.....	28
4.6. Atividade tripanocida.....	29
4.6.1. Efeito sobre formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	29
4.6.2. Efeito tripanocida sobre amastigotas intracelulares.....	29

4.7. Ensaio de reversibilidade (washout).....	30
4.8. Análise físico-química <i>in sílico</i>	31
4.9. Predição <i>in sílico</i> de propriedades ADMET.....	31
4.10. Análise da atividade em cisteína proteases.....	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1. Desenho racional dos compostos.....	33
5.2. Predição das propriedades físico-químicas dos derivados de pirazol.....	35
5.3. Citotoxicidade e efeito antiparasitário <i>in vitro</i>	42
5.4. Relação estrutura atividade (SAR) dos derivados de pirazol.....	43
5.5. Efeito da atividade dos compostos na reversibilidade da infecção..	52
5.6. Eficácia dos compostos promissores no modelo 3D.....	54
5.7. Propriedades ADMET dos compostos promissores.....	57
5.8. Efeito inibitório da atividade de cisteína protease.....	59
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÃO.....	69
8. REFERÊNCIAS	70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial da doença de Chagas.....	2
Figura 2. Distribuição geográfica das DTUs de <i>T. cruzi</i>	6
Figura 3. Formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> : tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas.....	8
Figura 4. Ciclo biológico de <i>T. cruzi</i> , envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados.....	9
Figura 5. Estruturas dos fármacos utilizados na clínica para doença de Chagas.....	14
Figura 6. Estrutura química do anel pirazólico.....	19
Figura 7. Estrutura dos derivados de pirazol.....	34
Figura 8. Análise das propriedades físico-químicas dos compostos das séries 1 a 5.....	36
Figura 9. Análise das propriedades físico-químicas dos compostos das séries 1 a 5.....	37
Figura 10. Gráfico radar de biodisponibilidade dos híbridos pirazol-carboxamida (séries 1 e 2).....	39
Figura 11. Gráfico radar de biodisponibilidade dos híbridos pirazol-imidazolina (séries 3).....	40
Figura 12. Gráfico radar de biodisponibilidade dos híbridos pirazol-imidazolina (séries 4 e 5).....	41
Figura 13. Inibição da reversibilidade da infecção <i>in vitro</i>	53
Figura 14. Efeito tripanocida dos derivados 3g, 3j e 3m no microtecido.....	55
Figura 15. Atividade biológica dos derivados 3g, 3j e 3m no microtecido.....	56
Figura 16. Efeito dos derivados pirazol-imidazolina na atividade de cisteína proteases.....	60

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Citotoxicidade e efeito tripanocida de derivados de pirazol.....	44
Tabela 2. Análise de relação estrutura-atividade (SAR) dos derivados de pirazol (séries de pirazol-carboxamida e pirazol-imidazolina).....	46-51
Tabela 3. Análise ADMET <i>in silico</i> dos derivados pirazol-imidazolina (3g, 3j e 3m) e BZ.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADMET: Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
BZ: Benzonidazol
CC₅₀: Concentração que inibe a viabilidade em 50% das células
CC₉₀: Concentração que inibe a viabilidade em 90% das células
CCC: Cardiomiopatia chagásica crônica
CEUA: Comitê de ética no uso de animais experimentais
CG-MS: Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas
CQ: Cloroquina
CZ: Cruzipáina
DC: Doença de Chagas
DAPI: 4,6'-Diamidino-2'fenilindol
DMEM: *Double Modified Eagle Medium* (Meio Eagle modificado por Dulbecco)
DMSO: Dimetilsufóxido
DNDi: *Drugs for Neglected Diseases initiative* (Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas)
DNT: Doença Tropical Negligenciada
DTT: Ditioneitol
DTU: *Discrete Typing Units* (Unidades discretas de tipagem)
ECG: Eletrocardiograma
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
FDA: *Food and drug administration* (Administração de comidas e medicamentos)
Fe-SOD: Superóxido dismutase dependente de ferro
Fsp3: Fração de carbono sp³
HBA: Número de átomos aceptores de ligação de hidrogênio
HBD: Número de átomos doadores de ligação de hidrogênio
HIV: *Human immunodeficiency virus* (Vírus da imunodeficiência humana)
IC₅₀ - Concentração que inibe a viabilidade 50% dos parasitos
IC₉₀ - Concentração que inibe a viabilidade 90% dos parasitos
IS: índice de seletividade
LogP: Lipofilicidade
MS: Ministério da Saúde
Nif: Nifurtimox

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

PAINS: *Pan-assay interference compounds*

pIC50: Potência biológica

PCR: *polymerase chain reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PDB: *Protein Data Bank*

PM: Peso molecular

SFB: Soro fetal bovino

TPSA: Área de superfície polar topológica

UAL: Unidade arbitrária de luminescência

VP: vacúolo parasitóforo

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

1.1.1. A descoberta: breve histórico

A doença de Chagas (DC) foi descoberta em 1909, pelo médico sanitarista e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, em uma de suas expedições de enfrentamento aos casos de malária entre os trabalhadores da estrada de Ferro Central do Brasil em Lassance, no sul de Minas Gerais (Dias et al., 2002). Nesse período, Carlos Chagas teve sua atenção despertada por insetos hematófagos de hábitos noturnos, conhecido como barbeiro por picar preferencialmente a região da face e que se abrigavam nas frestas de casas de pau-a-pique e tijolos de barro. A curiosidade do pesquisador o levou a dissecar insetos da espécie *Panstrongylus megistus* onde encontrou protozoários flagelados em seu intestino, denominado *Trypanosoma cruzi* em homenagem a seu mentor Oswaldo Cruz (Chagas, 1909). Em seguida, registrou também a primeira infecção natural de um mamífero em um gato doméstico.

Na mesma época, Carlos Chagas reportou o primeiro relato de infecção humana, identificado na menina Berenice de 2 anos que apresentava febre, palidez e, edema subpalpebral (possível porta de infecção). Ao observar um esfregaço de amostra de sangue de Berenice, o médico sanitarista identificou novamente os protozoários flagelados (Chagas 1909). Assim, Carlos Chagas, além descobrir uma nova doença, descobriu também: (i) um novo parasito; (ii) seu inseto vetor e (iii) seu ciclo biológico, sendo seus achados considerados um marco na história da medicina.

1.1.2. Aspectos epidemiológicos

A DC afeta atualmente cerca de 6 – 7 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO 2021). Esta doença centenária é endêmica em 21 países da América Latina (Figura 1) e reportada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre as 20 doenças tropicais negligenciadas (DTNs). Estima-se que 5.742.167 pessoas estejam infectadas por *T. cruzi* na América Latina, das quais 3.581.423 (62,4%) são residentes em nações da Iniciativa dos Países do Cone Sul, destacando-se a Argentina (1.505.235), o Brasil (1.156.821) e o México (876.458) seguidos da Bolívia (607.186)

(WHO 2015). A DC causa elevada morbidade e mortalidade, com cerca de 10 mil mortes/ano e estima-se que 75 milhões de indivíduos estão sob risco de contrair a doença (WHO 2020).

Por apresentar curso clínico lento e frequentemente assintomático, a DC é uma doença silenciosa e identificada como a maior causa de insuficiência cardíaca induzida por agentes infecciosos na América Latina (Bocchi, 2013). Neste contexto, destaca-se o Brasil e a Argentina como países que concentram 42% de todos os casos de cardiomiopatia chagásica (WHO 2015).

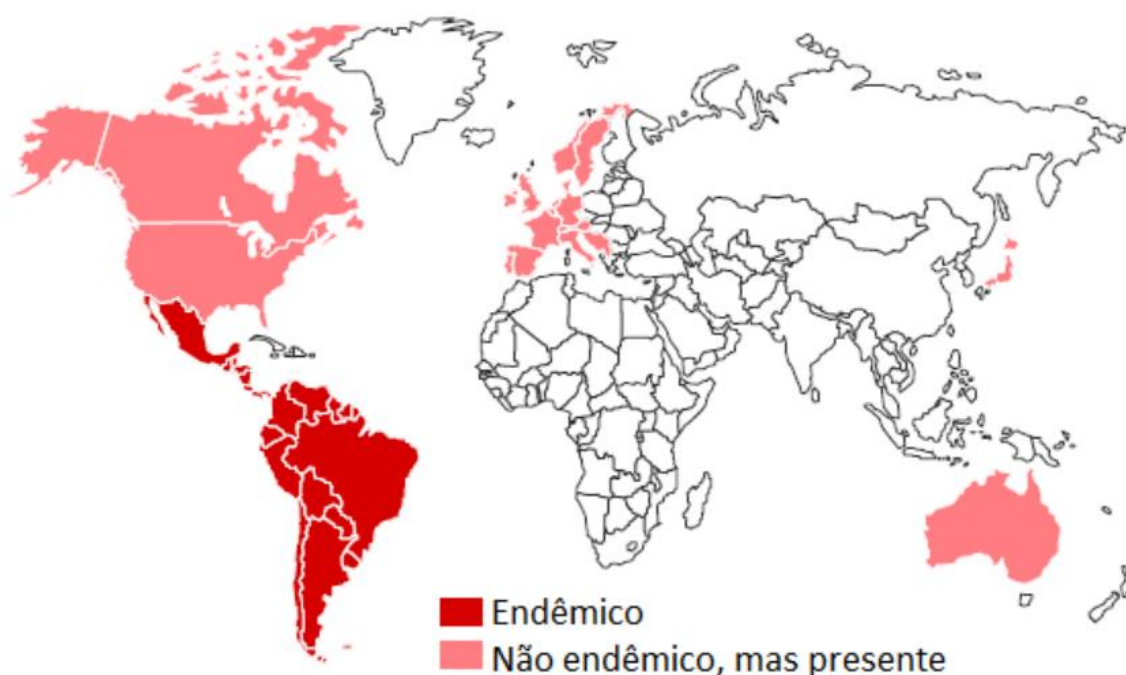


Figura 1. Distribuição mundial da doença de Chagas. Países da América Latina apresentam regiões endêmicas da doença de Chagas. Países da América do Norte e Europa e ainda, Austrália e Japão representam países não endêmicos. Adaptado de Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi), 2017.

Entre os anos de 1975 e 1980, a prevalência da infecção por *T. cruzi* e a distribuição dos vetores no Brasil foi mapeada no primeiro inquérito nacional realizado pelo Ministério da Saúde (MS) (Ministério da Saúde 2020). Em 1991, os países do Cone Sul, Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, tiveram a iniciativa de criar medidas de controle da transmissão de *T. cruzi* por via vetorial e transfusional (Dias & Schofield 1998). Essas iniciativas visavam o controle do inseto vetor, principalmente o *Triatoma infestans*, por meio de uso de inseticidas nas residências, melhora nas

condições de moradia e ainda, o controle de bancos de sangue. Com isso, houve uma redução significativa na transmissão de *T. cruzi* (Dias & Schofield 1998). Anos depois, em 2006, o Brasil recebeu a certificação internacional de controle da transmissão vetorial por *T. infestans*, principal transmissor domiciliar, conferida pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) (Ministério da Saúde 2006). Os achados do último inquérito nacional realizado em crianças de áreas rurais endêmicas, no período de 2001 a 2008, revelaram uma prevalência de infecção inferior a 0,1% comparado a 4,22% de infecção na população geral entre 1975 e 1980 (Ministério da Saúde 2020). Estes dados demonstram o êxito no controle da transmissão da doença por via vetorial sustentada no Brasil.

Embora o número de indivíduos acometidos pela DC tenha reduzido na América Latina nas últimas décadas, devido a implementação de campanhas para o controle vetorial e a triagem em bancos de sangue, um grande aumento no número de casos tem sido observado em países não endêmicos. Em virtude da migração de indivíduos infectados e modos específicos de transmissão do parasito, principalmente por via congênita e transfusional, disseminou a DC além de suas fronteiras geográficas naturais, sendo atualmente um problema de saúde pública mundial (Carlier, 2011). Registros de imigração desde a década de 1990 são associados a um aumento dramático no número de casos de DC em países não endêmicos da América do Norte (Canadá e Estados Unidos da América - EUA), Europa (especialmente a Espanha, Portugal e Itália) e região do Pacífico Ocidental (Austrália, Nova Zelândia e Japão) (Figura 1). Esses países não endêmicos apresentam 14% dos custos globais (7,2 bilhões/ano) com cuidados médicos e internações hospitalares por incapacidade geradas pela DC (Lee, et al., 2013).

Considerando que grande parte da população afetada por DTNs vive em países de baixa e média renda, a DC compõe parte desse cenário impactando diretamente na qualidade de vida, economia e produtividade. Um estudo acerca da qualidade de vida de portadores da DC revelou que esta doença é a principal causa dos anos de vida ajustados por incapacidade no Brasil (Guarner et al., 2019). De fato, entre os anos de 1990 e 2016 constatou-se perda da capacidade produtiva causada por DTNs no Brasil e, dados adicionais relataram que a DC foi responsável pela perda de aproximadamente 752.000 dias úteis devido a morbidade e mortes prematuras (Martins-Melo et al., 2016).

A carga econômica também é alta, apresentando o maior custo (média de \$129.211.209) com saúde da América Latina (Vizzoni et al., 2018). De acordo com o 2º Consenso Brasileiro de Doença de Chagas, de 2015, o país apresenta cerca de 1,2 a 4 milhões de indivíduos infectados, mas estima-se que estes números possam ser ainda maiores devido à baixa notificação de casos crônicos.

Na década de 80, no total de 3.026 municípios investigados no Brasil, apenas 367 (12,1%) não apresentaram soropositividade para *T. cruzi*. Em 95 municípios, as taxas de soroprevalência foram superiores a 30,1%, e 10 destes estiveram acima de 50,1% das taxas de positividade (Silveira et al., 2011). Dados atuais do MS reportam registros de casos agudos confirmados no período de 2010 a 2019 em 186 municípios distribuídos nas regiões do Brasil, como: Norte com 136 municípios (56,6% no Pará), Nordeste com 26 municípios (38,5% no Maranhão), Centro-Oeste com 14 municípios (71,4% em Goiás), Sudeste com 6 municípios (50% em São Paulo) e Sul com 4 municípios no Rio Grande do Sul.

Um total de 51.293 mortes foram notificadas no período de 2007 a 2017 com 25% dos óbitos (12.902) em Minas Gerais (Ministério da Saúde 2020), demonstrando um cenário preocupante e que necessita de atenção. Em decorrência de programas bem-sucedidos de controle vetorial e de bancos de sangue, incluindo em países não endêmicos, e devido à falta de medidas oficiais de controle em mulheres gestantes na América Latina, as taxas de transmissão congênita vêm despertando a atenção. Essas taxas variam de 1 a 28,6%, com cerca de 9.000 casos estimados por ano (WHO, 2020). Os índices de transmissão vertical de *T. cruzi* na Europa variam de 2,6% a 13,8%, com uma taxa média de 6% (Antinori et al., 2017). Em Madrid, por exemplo, 44% das mulheres grávidas infectadas apresentam parasitemia detectável por reação em cadeia da polimerase (PCR) (Florez-Chavez et al., 2011). Assim, destaca-se a importância de implementação de triagem para DC no acompanhamento médico da mulher durante a gravidez, controle da infecção congênita e tratamento precoce de neonatos infectados por *T. cruzi*. No Brasil, um grande avanço para a vigilância epidemiológica em 2020, foi a inserção da fase crônica como notificação compulsória nacionalmente (Ministério da Saúde 2020). Até o momento, apenas a fase aguda era registrada na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória e Imediata (Ministério da Saúde 2020).

Na última década, a OMS juntamente com parceiros governamentais e privados firmaram um Programa visando controlar, eliminar e erradicar as 20 DTNs no período

de 2010 a 2020 (London Declaration, 2012), sendo elas: Doença de Chagas, Tripanossomíase africana, Leishomaniose, Malária, Filariose linfática, Teníase, Esquistossomose, Dracunculíase, Oncocercos, Equinococose, Hanseníase, Tuberculose, Úlcera de buruli, Boubá, Tracoma, Raiva, Dengue, AIDS, Micetoma e helmintoses transmitidas pelo solo. Progressos significativos foram alcançados em diferentes doenças, principalmente verminoses, mas poucos avanços foram reportados para DC (Holtez & Aksoy 2017). Neste cenário destaca-se a formulação pediátrica do benzonidazol (BZ; fármaco de referência utilizado na clínica) e a aprovação do BZ pela agência de Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (*Food and drug administration* – FDA). Recentemente, um novo Programa de controle e erradicação de DTNs foi lançado pela OMS para o período de 2021-2030 e enfatiza a atenção à saúde dos portadores da DC, avanço no diagnóstico, controle de vetores, identificação de biomarcadores assim como, a busca de novos fármacos efetivos e seguros para a terapia da doença (WHO 2020).

1.1.3. Agente Etiológico

A DC é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* pertencente ao reino protista, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma* (seção Stercoraria, subgênero *Schizotrypanum*) (Cavalier-Smith, 2010). Embora classificado como uma única espécie, este parasito apresenta uma elvada diversidade genética, corroborada por dados do genoma de algumas linhagens de *T. cruzi* (Ackerman et al., 2012). Na era genômica, houve avanço na caracterização populacional de *T. cruzi*, na história evolutiva do parasito, sua ecoepidemiologia, suas relações com hospedeiros e vetores e a possibilidade de abordar aspectos de virulência e resistência aos medicamentos (Zingales et al., 2009).

Neste contexto, *T. cruzi* foi dividido em grupos denominados como unidades discretas de tipagem (do inglês *Discrete Typing Units* - DTUs). Os agrupamentos em DTUs pôde ser definido como um conjunto de populações geneticamente semelhantes e identificáveis por marcadores genéticos, moleculares e imunológicos comuns (Tibayrenc 1998). Inicialmente, *T. cruzi* foi dividido em 6 DTUs: Tc I – VI (Zingales et al., 2012), mas uma sétima DTU restrita a morcegos, denominada TcBat, que apresenta capacidade de infectar humanos (Ramírez et al., 2014), também foi

identificada (Marcili et al., 2009). Assim, *T. cruzi* está classificado atualmente em 7 DTUs (Tc I – VI e TcBat) com distinta distribuição geográfica nas Américas (Figura 2) (Zingales et al., 2012; 2018).

No Brasil, TcI é predominante em infecções humanas principalmente na região norte do país. (Figura 2). TcII é altamente abundante em pacientes crônicos no sudeste e nordeste enquanto TcIII está principalmente associado ao ciclo silvestre (Nielebock et al., 2020; Zingales et al., 2018). TcIV é encontrado principalmente em ciclos silvestres na Amazônia brasileira, mas com relatos de surtos de infecção oral (Santana et al., 2019; Zingales, 2018). Por outro lado, TcVI predomina na região Sul e Sudeste do país.

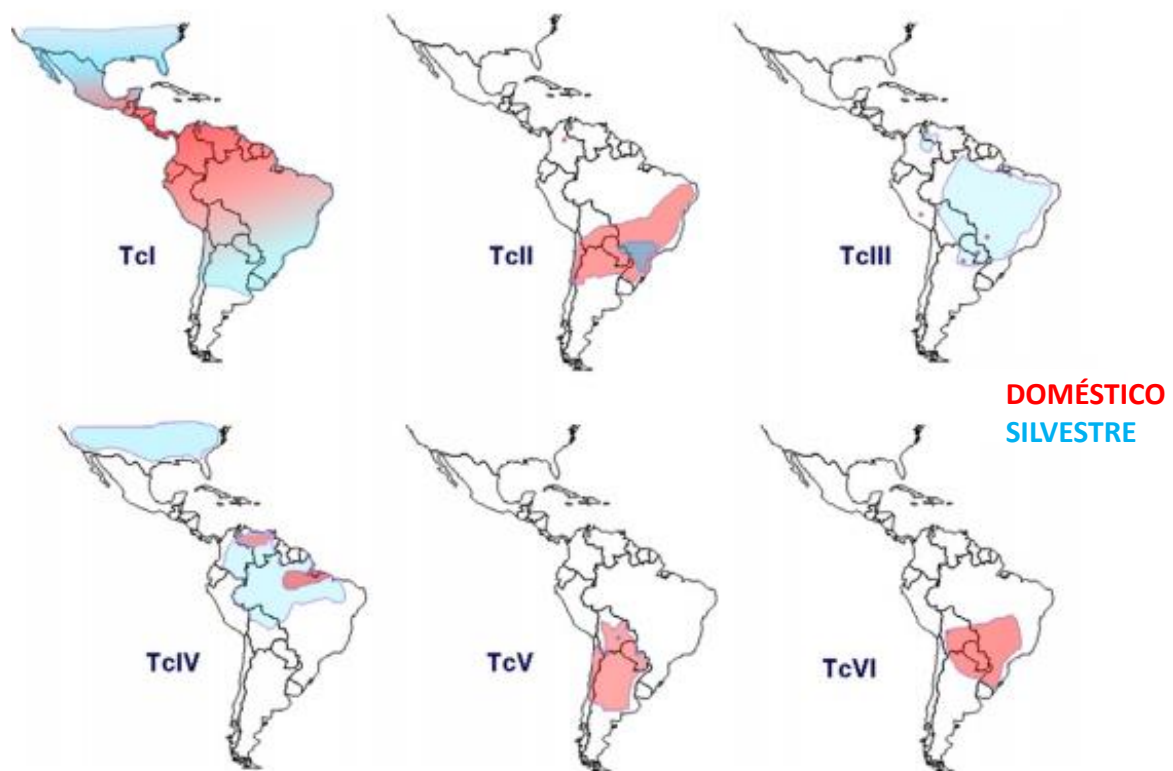


Figura 2. Distribuição geográfica das DTUs de *T. cruzi* (TcI-TcVI) nas Américas. Adaptado de Zingales et al., 2012.

Embora alguns estudos tenham concentrado esforços para correlacionar a ecoepidemiologia e genotipagem de *T. cruzi* com as manifestações clínicas da doença, até o momento os resultados apresentados não são conclusivos. A DTU TcI,

por exemplo, apresenta manifestações clínicas importantes que inclui cardiomiopatia chagásica crônica, possuindo alta patogenicidade e baixa sensibilidade a fármacos. No entanto, assim como TcI, TcII também possui desenvolvimento de formas crônicas graves como manifestações cardíacas e em alguns casos, manifestações digestivas como megacólon e megaesôfago (Zingales et al., 2014; 2018).

Quanto as características morfológicas e biológicas do parasito, *T. cruzi* possui diferentes estágios de desenvolvimento em seu ciclo de vida (revisto por Tyler and Engman 2001). As formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* são identificadas morfológicamente e de acordo com a posição do flagelo em relação ao núcleo quando comparados ao cinetoplasto, uma região da mitocôndria onde concentra-se o DNA mitocondrial (kDNA) (Figura 3). O kDNA é composto por maxicírculos, que codificam para proteínas da cadeia de transporte de elétrons e RNA ribossômico mitocondrial, e minicírculos que codificam pequenos RNAs envolvidos no processo de editoração dos transcritos do maxicírculo (Tomasini 2018).

Tripomastigotas são formas infectantes e não-replicativas que possuem morfologia alongada, cinetoplasto circular com kDNA condensado e bolsa flagelar localizados na região posterior ao núcleo. O flagelo emerge da bolsa flagelar e acompanha toda a extensão do corpo, tornando-se livre na região anterior do parasito (Figura 3). Estas formas são encontradas na região posterior do trato intestinal do inseto vetor (tripomastigotas metacíclicos) e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (tripomastigotas sanguíneos).

Amastigotas são formas proliferativas encontradas no interior de células do hospedeiro vertebrado. Embora não sejam formas infectivas clássicas, as formas amastigotas também são capazes de invadir células de mamíferos (Ley et al., 1998). Apresentam morfologia arredondada com núcleo grande e pouco citoplasma. O cinetoplasto apresenta forma de barra com kDNA condensado e localiza-se próximo a bolsa flagelar na região anterior ao núcleo (Figura 3).

Epimastigotas são formas proliferativas encontradas no trato digestório do inseto vetor e não possui capacidade de infectar hospedeiros mamíferos. Apresentam morfologia alongada com cinetoplasto em forma de barra com kDNA condensado e próximo a bolsa flagelar na região anterior ao núcleo. O flagelo longo emerge lateralmente ao corpo do parasito (Figura 3).

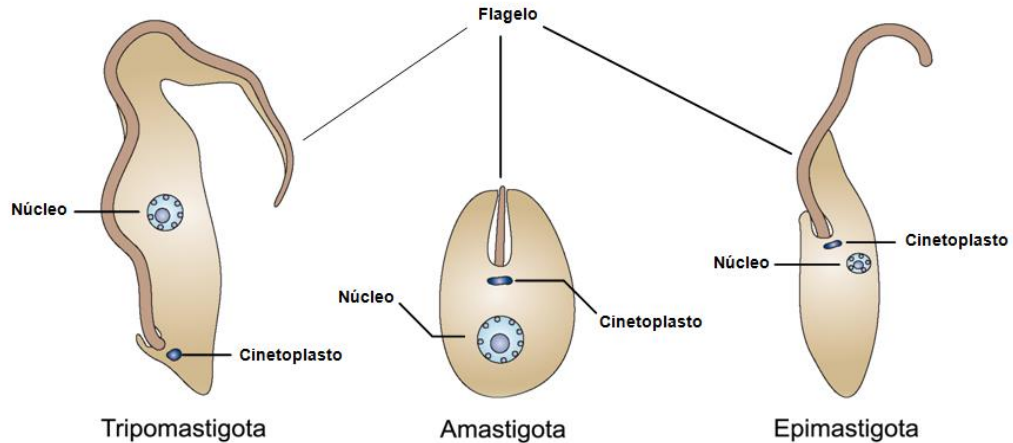


Figura 3. Formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*: tripomastigotas, amastigotas e epimastigotas. Epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos são encontradas no insetor vetor enquanto tripomastigotas e amastigotas estão presentes no hospedeiro mamífero (Adaptado de Docampo et al., 2005).

1.1.3.1. Ciclo biológico

T. cruzi possui um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, envolvendo hospedeiros invertebrados e vertebrados (revisado por Tyler and Engman 2001). Ao se alimentar em um hospedeiro mamífero infectado, o triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas que, em grande parte, são lisadas no estômago do inseto e, os que sobrevivem transformam-se em epimastigotas, se multiplicam repetidamente e se fixam as membranas perimicrovilares (Alves et al., 2007) (Figura 4). Na extremidade posterior do intestino, os epimastigotas aderem à cutícula retal e se transformam em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese) que são liberados junto com as fezes e urina durante um novo repasto sanguíneo. Os tripomastigotas metacíclicos, liberados nas fezes, penetram no hospedeiro vertebrado através do local da picada, fissuras na pele e/ou mucosas, interagindo com células do tecido conjuntivo e macrófagos (Figura 4).

Após invasão celular, os tripomastigotas localizados em um endossomo (fagossomo ou vacúolo parasitóforo - VP), logo se fundem com lisossomos que acidifica o conteúdo deste compartimento intracelular. Posteriormente, o VP sofre fragmentação pela ação da proteína formadora de poros transmembranares (Tc-Tox) secretada pelo parasito, um peptídeo que tem homologia com o fator 9 do complemento (Andrews et al., 1995). Ainda, o microambiente ácido do VP atua como

indutor da diferenciação dos parasitos em amastigotas que se multiplicam sucessivamente por divisão binária no citosol, seguido de diferenciação em tripomastigotas. Devido à intensa motilidade, os tripomastigotas rompem a célula hospedeira e são capazes de invadir células adjacentes ou atingir a corrente sanguínea, alcançando diferentes tecidos. Durante novo repasto sanguíneo, o inseto vetor ingere formas tripomastigotas sanguíneas circulantes no sangue do hospedeiro mamífero infectado, dando continuidade ao ciclo biológico (Figura 4) (Goldenberg et al., 2020; De Souza, 2010).

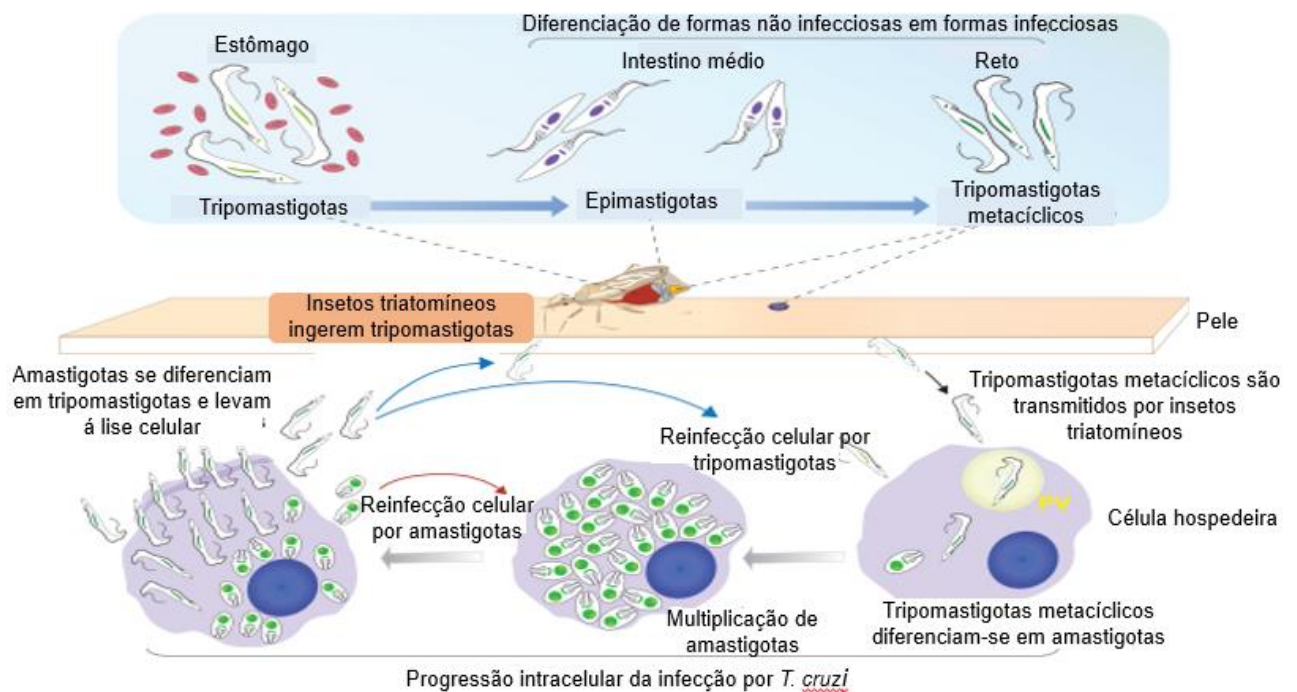


Figura 4. Ciclo biológico de *T. cruzi*, envolvendo hospedeiros vertebrados e invertebrados. Estágios de desenvolvimento no inseto vetor (A) e hospedeiro mamífero (B). Adaptado de Moretti, Mortara & Schenkman, 2019.

1.1.3.2. Modo de transmissão

São seis as principais formas de transmissão de *T. cruzi* ao homem, descritas até o momento: (i) via vetorial, (ii) por transfusão de sangue e transplante de órgãos de indivíduos infectados, (iii) via congênita ou vertical, (iv) infecção oral pela ingestão de alimentos contaminados, (v) via sexual e (vi) acidentes de laboratório (Pérez-Molina 2018). A transmissão vetorial ou natural ocorre por 145 espécies de três gêneros de triatomíneos: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodinus*, amplamente distribuídos na América Latina. No Brasil, foram identificados até o momento 65 espécies de triatomíneos (Galvão et al., 2014), sendo 5 espécies, *T. infestans*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *P. megistus*, reconhecidas como transmissores domiciliares relevantes (Silveira et al. 1984). Ainda, registrou-se no período de 2014 a 2018 o encontro de triatomíneos no intradomicílio em 1.724 municípios, com maior frequência das espécies: *T. pseudomaculata* (598 municípios), *T. sordida* (524 municípios) e *T. brasiliensis* (456 municípios). A presença do vetor em peridomicílio foi registrado em 1.440 municípios, a maioria destes por *T. sordida* (523 municípios), *T. pseudomaculata* (500 municípios) e *T. brasiliensis* (424 municípios) (Ministério da Saúde 2020). Estes dados reforçam a necessidade de se fortalecer as ações de vigilância entomológica no país.

Além da transmissão vetorial, a via transfusional e transplante de órgãos são potenciais formas de transmissão de *T. cruzi*. A transmissão por transplante de órgãos ocorre principalmente quando os órgãos doados são rins, pâncreas, fígado, coração e medula óssea (Gómez et al., 2019). As taxas de infecção após o transplante de órgão sólido de um doador infectado parecem ser mais baixas para receptores de rim (0 a 19%) do que para receptores de fígado (0 a 29%) e receptores de coração (75 a 100%) (Pérez-Molina & Molina 2018). O diagnóstico da DC antes do transplante é de extrema importância para o controle da transmissão.

A transmissão de *T. cruzi* via hemotransfusão aumentou devido ao êxodo rural, sendo predominante em países que não há obrigatoriedade de triagem em bancos de sangue. No Brasil, a triagem nos bancos de sangue teve início na década de 80 e reduziu a prevalência de doadores soropositivos para DC de 4,4% em 1980 para 0,2% em 2005 (Chao et al., 2020).

Com o controle das vias vetoriais e transfusionais de infecção por *T. cruzi*, a transmissão congênita tornou-se importante fonte de novos casos. Desde a década

de 80, mulheres residentes em áreas endêmicas para DC, têm migrado para países não endêmicos em busca de oportunidades de emprego e melhores condições de vida. Com isso, os casos de transmissão congênita têm ganhado destaque em países como EUA, Canadá, Europa e Japão (Oliveira et al., 2010). A transmissão vertical é relatada em 4,7% dos casos (Pérez-Molina & Molina 2018). Porém, é muito provável que esses números não retratem a realidade com taxas de infecção mais elevadas, uma vez que a maioria das crianças com infecção congênita é assintomática e muitas vezes o diagnóstico não é realizado no momento do parto (WHO 2020).

Ainda, a infecção oral tem sido relatada como importante via de transmissão, causando surtos principalmente em locais onde a transmissão via vetorial foi controlada. *T. cruzi* pode permanecer viável por 24 horas em alimentos e bebidas, favorecendo assim sua transmissão por via oral (Cardoso et al., 2006). No Brasil, no período de 2000 a 2010 foram relatados mais de 1.000 casos agudos, onde 776 foram atribuídos a transmissão oral (Diaz et al., 2014). Em 2005, surto de infecção oral através da ingestão de suco de cana-de-açúcar contaminado foi notificado em Santa Catarina. Em 2006, tiveram novos surtos relacionados ao consumo de açaí e verduras contaminadas nos estados do Pará e Bahia, respectivamente (Filigheddu et al., 2017). Um total de 150 surtos foram registrados de 2007 a 2016, com média de 15,4 surtos/ano, acometendo cerca de 850 indivíduos com maior incidência no estado do Pará seguido do estado do Amapá (Ministério da Saúde 2020).

Em menor número de casos, a transmissão de *T. cruzi* também pode ocorrer via sexual. Essa via de transmissão vem sendo sugerida desde o descobrimento da DC, porém com poucos estudos relatados. Recentemente, as análises em modelo murino comprovaram a transmissão de machos ou fêmeas para seus parceiros de acasalamento, onde testes moleculares, sorológicos e parasitológicos revelaram a presença de parasitos no sangue e tecidos dos animais infectados (Ribeiro et al., 2016; Araújo et al., 2017).

Embora poucos casos de transmissão por acidente de laboratório tenham sido relatados (Hofflin et al., 1997), é importante ressaltar que pessoas expostas a parasitos patogênicos devem ser esclarecidas sobre as precauções de segurança. Registros de transmissão acidental foram documentadas em práticas como: ações de captura de vetores em áreas endêmicas, aerossóis de materiais infectados, atividades experimentais em laboratório (*in vitro* e *in vivo*), incluindo recapeamento de agulhas, coleta de sangue e inóculo de animais experimentais entre outros (Dias et al., 2015).

1.1.4. Evolução clínica

A DC é uma doença silenciosa que apresenta duas fases clínicas: aguda e crônica. Após a infecção com *T. cruzi*, o indivíduo ingressa na fase aguda, que é caracterizada uma alta parasitemia, grande número de parasitos circulantes no sangue, e pode se prolongar por 4 a 8 semanas. Nesta fase, as manifestações clínicas são frequentemente inaparentes e a maioria dos indivíduos é assintomático. Quando ocorrem sintomas, eles incluem: febre prolongada, mal-estar, aumento do baço, fígado e nódulos linfáticos, edema subcutâneo (localizado ou generalizado), lesão cutânea endurecida (chagoma) e edema palpebral unilateral conhecido como sinal de Romaña (quando a conjuntiva é a porta de entrada do parasito) (Perez-Molina et al., 2018; Rassi et al., 2010). No entanto, doença aguda grave ocorre em 1 a 5% dos pacientes com sintomas clínicos como miocardite aguda, derrame pericárdico e meningoencefalite (revisto por Pérez-Molina & Molina 2018).

Nos casos sem diagnóstico e, conseqüentemente, sem tratamento na fase aguda, os indivíduos evoluem para a fase crônica, quando ocorre declínio da parasitemia com raros parasitos circulantes. A fase crônica tem evolução lenta e progressiva, e é assintomática (forma indeterminada) em 70% dos casos, sendo caracterizada por testes parasitológicos ou sorológicos positivos, um eletrocardiograma (ECG) normal, exames radiológicos do tórax, esôfago e cólon normais e ausência dos sintomas e sinais clínicos da DC (Lidani et al., 2019; Marin-Neto et al., 2002). Algumas pessoas (30-40% dos casos) podem apresentar a forma sintomática da doença após 10 a 30 anos da infecção aguda, onde 10% dos indivíduos possuem alterações digestivas ou neurológicas e 30-40% possuem alterações cardíacas ou mistas (cardíaca e digestiva), (Nunes et al., 2018; Rassi Jr. et al., 2012).

A forma digestiva é caracterizada por um quadro de dilatação de vísceras ocas, com formação das megavísceras, sendo mais comuns megaesôfago e megacólon. O megaesôfago causa disfagia com odinofagia, combinada com dor epigástrica, regurgitação, ptialismo e desnutrição. O megacólon costuma afetar o segmento sigmoide, reto ou cólon, produzindo constipação prolongada, distensão abdominal e as vezes, obstrução do intestino grosso (Rassi et al., 2010).

A forma cardíaca é a mais grave manifestação clínica da DC e leva a anormalidades nos sistemas de condução, bradiarritmias e taquiarritmias, aneurismas apicais, insuficiência cardíaca, tromboembolia e morte súbita (Rassi et al., 2010). O

dano no miocárdio é um acometimento bem comum da forma cardíaca e é geralmente um processo progressivo que pode ser classificado em estágios (A, B, C e D), conforme recomendações. Estágio A: fase indeterminada – ECG normal; estágio B: anormalidades no ECG; estágios C e D: aparecimento de sintomas de insuficiência cardíaca (Andrade et al., 2011). Destaca-se ainda, que pacientes com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) tem maior risco de morte súbita que outras cardiomiopatias, sendo responsável por 60% das mortes de pacientes com CCC (Neeki et al., 2017). Indivíduos cronicamente infectados e imunocomprometidos, como coinfectados com vírus da imunodeficiência humana (HIV), apresentam reativação da doença (Bern, 2012), com retorno da parasitemia patente, corroborando a persistência do parasito na fase crônica.

1.1.5. Tratamento clínico

O tratamento da DC se baseia em dois nitroderivados descobertos de forma empírica e introduzidos na clínica há mais de 50 anos: o Nifurtimox (Nif) e o Benzonidazol (BZ) (Figura 5). Na década de 60, resultados positivos foram alcançados com nitrofurazona (5-nitro-2-furaldeído-semicarbazona), que administrado via oral por 53 dias (100 mg/kg/dia) resultou em cura de 95,4% dos camundongos infectados por *T. cruzi* (Brener 1961). Resultados clínicos satisfatórios foram alcançados em casos de infecção aguda com *T. cruzi* após tratamento com nitrofuranos, apresentando poucos efeitos colaterais (Ferreira et al., 1963). O modo de ação do Nif envolve a geração do radical nitro ânion por nitroredutases que, na presença de oxigênio, levam a intermediários reativos e, sendo *T. cruzi* parcialmente deficiente nos mecanismos de desintoxicação dos radicais livres é suscetível a tais intermediários (revisado em DoCampo & Moreno 1986). O BZ possui seu mecanismo de ação em *T. cruzi* baseado na ação da enzima nitroredutase do tipo I. Em uma série de reações, as nitroredutases que são dependentes de NADPH-citocromo P450 redutase, catalisam 2-nitroimidazol a uma hidroxilamina, por meio de um intermediário nitroso, em uma reação de transferência de duas etapas. A hidroxilamina é posteriormente convertida, por meio de uma série de transformações não enzimáticas, até a liberação do dialdeído glioxal, capaz de interagir com proteínas, DNA, RNA e pequenas moléculas. Esses metabólitos reativos são tóxicos, resultando em um efeito tripanocida rápido e

localizado contra as formas tripomastigotas e amastigotas do parasito (Kratz et al., 2018). A especificidade da nitroredutase e a falta de uma enzima correspondente no hospedeiro mamífero são responsáveis pela seletividade da ação do fármaco.

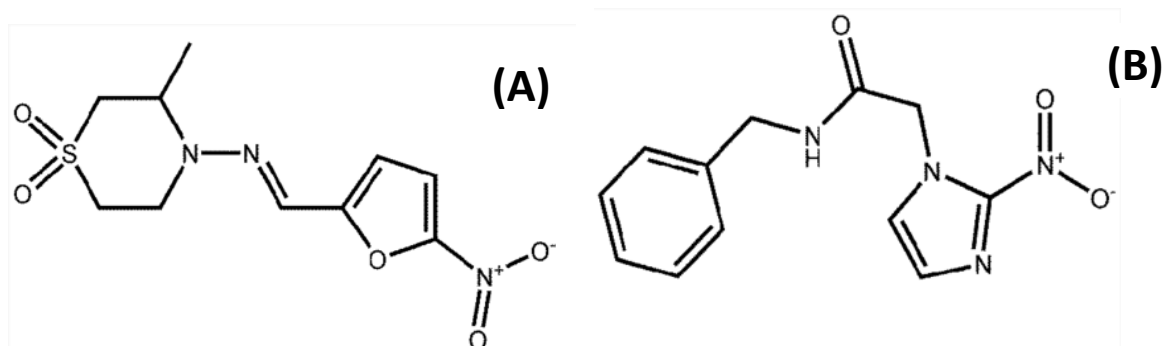


Figura 5. Estruturas dos fármacos utilizados na clínica para doença de Chagas. (A) nifurtimox; (B) benznidazol. Retirado de: <https://www.researchgate.net/publication/299471372>. Acessado em 23/05/2021.

Segundo as diretrizes da OPAS (2018) o tratamento tripanocida é fortemente recomendado em pacientes com infecção aguda ou congênita por *T. cruzi*. BZ é administrado por via oral em doses diárias de 5-8 mg/kg, subdivididas em duas ou três doses, até 60 dias, e o nifurtimox é administrado por via oral a uma dose de 8-10 mg/kg por dia durante 60-90 dias (Andrade et al., 2011). De acordo com o Segundo Consenso Brasileiro sobre Doença de Chagas de 2015, na fase aguda, o tratamento deve ser realizado em todos os casos, o mais rápido possível, sem levar em consideração a via de transmissão do parasito (Dias et al., 2016). No entanto, em pacientes crônicos acima de 50 anos, sem cardiopatia avançada, não existem estudos que justifiquem o tratamento antiparasitário. Pacientes com diagnóstico de DC congênita devem receber tratamento antiparasitário, independentemente do diagnóstico ter sido feito por métodos parasitológicos nas primeiras semanas de vida ou por testes sorológicos convencionais pelo menos nove meses após nascimento. Além disso, todas as crianças menores de 12 anos que estiverem em fase crônica devem ser tratadas (Dias et al., 2016).

Apesar de ainda serem recomendados, esses fármacos possuem efeitos adversos intensos como: hipersensibilidade cutânea com o surgimento de erupções, edema generalizado, linfadenopatia, febre, anorexia, perda de peso corporal, depressão da medula óssea, trombocitopenia e agranulocitose, polineuropatia,

parestesia e polineurites periféricas, ansiedade e sintomas pulmonares (Coura & de Castro 2002; Rassi et al., 2010; Aldasoro et al., 2017). No Brasil, apenas o BZ é utilizado como tratamento para DC. Porém, possui importantes limitações, incluindo eficácia variável (60 a 80%) em diferentes cepas de *T. cruzi* (Petrucci et al., 2019), contraindicação em pacientes com insuficiência renal e hepática (Bermudez et al., 2016) e em mulheres grávidas (Dias et al., 2011). Ainda, BZ foi incapaz de inibir a progressão da CCC (Morillo et al., 2015) e não é eficaz sobre formas amastigotas dormentes na fase crônica (Sánchez-Valdéz et al., 2018), destacando-se a necessidade de identificação de novos fármacos para o tratamento da DC.

Nas últimas décadas, ensaios clínicos têm gerado informações relevantes sobre eficácia e segurança terapêutica de fármacos promissores para o tratamento da DC. Derivados azólicos foram um dos poucos fármacos que avançaram para ensaios clínicos (fase II) na DC, mas até o momento com resultados insatisfatórios. O ensaio clínico CHAGAZOL realizado com posaconazol, um antifúngico inibidor da biossíntese de ergosterol e forte candidato ao tratamento da DC, demonstrou falha terapêutica. Os resultados revelaram que 92% e 82% dos pacientes que receberam baixas (100 mg) e altas (400 mg) doses de posaconazol por 60 dias, respectivamente, apresentaram teste de PCR positivo para *T. cruzi* (Molina et al., 2014). Também foi visto com o ensaio clínico “Estudo do Posaconazol Oral no Tratamento da Doença de Chagas Crônica Assintomática” (*Study of Oral Posaconazole in the Treatment of Asymptomatic Chronic Chagas Disease: STOP-CHAGAS*), que a terapia combinada de posaconazol com benzonidazol, não apresentou vantagens quando comparados com BZ em monoterapia. Posaconazol demonstrou atividade tripanostática durante o tratamento, mas é ineficaz a longo prazo em portadores assintomáticos de *T. cruzi* (Morillo et al., 2017). Foi ainda evidenciado, que posaconazol possui baixa atividade contra *T. cruzi* de replicação lenta de amastigotas e possui atividade mínima contra parasitos em estágio de tripomastigotas (MacLean et al., 2018).

Assim como posaconazol, o composto E1224 (pró fármaco de Ravuconazol), também apresentou resultados insatisfatórios. A eliminação do parasito foi observada durante o período de tratamento, mas não houve resposta sustentada, ou seja, E1224 apresentou um efeito supressivo transiente enquanto o benzonidazol demonstrou eficácia precoce e sustentada até 12 meses de acompanhamento (Torrico et al., 2018). Fexinidazol teve seu ensaio clínico interrompido devido à baixa tolerabilidade, mas apresentou elevada eficácia em baixas doses e, portanto, encontra-se em novo

ensaio clínico com doses e esquemas reduzidos com previsão de término em 2021 (DNDi 2018).

Entretanto, o ensaio clínico “Novas dosagens de benzonidazol, tratamento aprimorado e associações” (*Benznidazole New Doses Improved Treatment & Associations* – BENDITA) demonstrou eficácia com diferentes doses (150 e 300 mg) e regimes curtos (2 a 4 semanas) de tratamento com Bz, trazendo novas esperanças para os portadores da DC. Além de eficácia similar ao tratamento padrão (300 mg/8 semanas), estes novos regimes de tratamento não acarretaram efeitos colaterais, que certamente irá impactar na redução das taxas de abandono do tratamento assim como, promover maior adesão dos pacientes ao novo esquema de tratamento com BZ (DNDi, 2018). Embora os resultados tenham sido promissores, este estudo foi conduzido com um pequeno número de pessoas (n = 210). Estudos com regimes mais curtos de BZ seguirão para fase III na Colômbia, Brasil e Bolívia no âmbito da Central Internacional para a Compra de Medicamentos contra a AIDS, Malária e Tuberculose (Unitaid, sigla em inglês). Novo ensaio clínico, denominado CUIDA CHAGAS, envolvendo Brasil, Bolívia, Colômbia e Paraguai e conduzido pelo Ministério da Saúde do Brasil (Fiocruz), Unitaid e DNDi, visa aprimorar tecnologias de diagnóstico, tratamento e cuidado integral para mulheres e recém-nascidos acometidos pela DC (DNDi 2021).

Embora as novas perspectivas de ensaios clínicos sejam promissoras, a descoberta de novos fármacos, seja pela otimização de compostos ativos, reposicionamento de fármacos aplicados na clínica ou terapia combinada com BZ, permanece uma importante estratégia para o tratamento da DC, visando a identificação de fármacos com baixa toxicidade e efetivos nas duas fases da doença.

1.1.6. Inibidores de cruzipáina: um potencial terapêutico

Uma etapa fundamental na descoberta de novos fármacos é a identificação do alvo. Em geral, envolve a triagem de bibliotecas de compostos contra um alvo molecular definido (triagem baseado no alvo), principalmente enzimas, ou contra todo o organismo (triagem fenotípica). Diferentes rotas metabólicas e alvos macromoleculares de *T. cruzi* foram apontados como potenciais alvos terapêuticos, incluindo (i) proteases (principalmente cisteína protease), (ii) via glicolítica (com

ênfase principalmente nas enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, a hexoquinase e a fosfofrutoquinase), (iii) biossíntese de esteróis (com ênfase principalmente nas enzimas esterol 14- α -demetilase, lanosterol sintase e esqualeno sintase), (iv) metabolismo dependente de grupos tióis (triptanotona redutase e sintase), (v) transferência de ácido siálico (trans-sialidase) e (vi) DNA topoisomerases (DNA topoisomerases I e II) (Vannier-Santos et al., 2019, Duschak et al., 2011). Ainda, a expectativa de resultados promissores no ensaio clínico com Fexinidazol tem renovado o interesse na pesquisa de novos nitroderivados com elevada potência e baixa toxicidade. Além disso, considerando-se a diversidade de alvos terapêuticos e vias metabólicas do parasito, além das estratégias de reposicionamento de fármacos, combinação de compostos e fármacos com BZ e descoberta de novos fármacos, a concepção de associação de múltiplos fármacos/compostos, com ênfase em enzimas envolvidas em diferentes processos fisiológicos, tem surgido como nova perspectiva para a terapia da DC (Ribeiro et al., 2020).

Cruzipaína (CZ), uma cisteína protease majoritária de *T. cruzi*, tem sido destacada como um importante alvo terapêutico, uma vez que esta protease está envolvida em diferentes eventos biológicos do parasito (Branquinha et al., 2015, Cazzulo et al., 2001). A CZ (40 – 45 kDa), também conhecida como cruzaina ou GP57/51, é uma enzima lisossomal que apresenta em sua estrutura um domínio catalítico, com alta homologia com papaína e algumas catepsinas de mamíferos, e uma extensão carboxiterminal (C-T) contendo 130 resíduos de aminoácidos (Cazzulo et al., 1995). Embora inicialmente descrita com localização lisossomal, a CZ também foi evidenciada em reservossomos de epimastigotas (Soares et al., 1999), na superfície celular de epimastigotas e amastigotas assim como, na região da bolsa flagelar de tripomastigotas (Souto-Padrón et al., 1990). Esta enzima destaca-se pelas múltiplas funções na biologia de *T. cruzi*, participando de eventos como invasão (Scharfstein et al., 2000), proliferação e diferenciação do parasito (Santos et al., 2005) assim como, evasão do sistema imunológico do hospedeiro (Doyle et al., 2011), tornando-se um alvo molecular relevante para o desenho de fármacos anti-*T. cruzi*.

Neste contexto, ensaios *in vivo* com dipeptídeos derivados de vinilsulfona (N-metil piperazina-Phe-homoPhe-vinilsulfona fenil) revelaram sua capacidade de inibir a mortalidade em camundongos com infecção aguda letal, reduzindo substancialmente a carga parasitária (Engel et al., 1998). Cura parasitológica foi reportada nestes animais na fase crônica de infecção após novo regime de tratamento com o derivado

vinilsulfona. K777, um derivado de vinilsulfona inibidor irreversível de cruzipaina e candidato promissor para o tratamento da DC, apresentou atividade contra uma variedade de cepas de *T. cruzi* suscetíveis e resistentes ao BZ (Mackerron et al., 2009). Ainda, K777 foi capaz de reduzir o dano no miocárdio, evidenciado por análise histológica e níveis de troponina I plasmática, em cães infectados por *T. cruzi* (Barr et al., 2005). No entanto, a baixa tolerabilidade em cães e primatas de vinilsulfona (K777), levou à descontinuidade dos ensaios pré-clínicos (DNDi 2014). Sintomas como vômitos, resultante do baixo pH da solução original do fármaco constituído de sal de ácido clorídrico (HCl), foi evidenciado em macacos tratados com altas (500 mg/kg) e baixas (50 mg/kg) doses, levando a interrupção do projeto. A neutralização do pH do fármaco eliminou os vômitos e permitiu a conclusão dos ensaios com 28 dias de tratamento, retomando a discussão sobre seu potencial no tratamento de infecções parasitárias (McKerrow 2018).

Vários inibidores reversíveis de cruzipaina, análogos de odanacatibe contendo a porção nitrila (inibidor seletivo e reversível da catepsina K), mostraram potente atividade anti-*T. cruzi in vitro* (Beaulieu et al., 2010) e altas taxas de cura (90%) em modelo murino de infecção por *T. cruzi* (Ndao et al., 2014). Além disso, com base em critérios de reposicionamento de fármacos, 3.180 fármacos aprovados pela FDA foram virtualmente pesquisados como um inibidor de cruzipaina, destacando quatro fármacos selecionados (clofibrato de etofilina, piperacilina, cefoperazona e flucloxacilina) com potente atividade antiparasitária *in vitro*, mas menor eficácia *in vivo* (Palos et al., 2017), demonstrando a necessidade de se avançar na identificação de fármacos mais efetivos.

Assim, este estudo está alinhado à proposta de desenho racional de novos fármacos e tem enfoque na otimização de análogos de pirazol, previamente identificado como inibidor de cruzipaina (Monteiro et al., 2019), uma classe de compostos que se destaca na química medicinal pela sua ampla atividade biológica (Naim et al., 2016).

1.1.7. Pirazol

O pirazol é um anel aromático heterocíclico de cinco membros contendo dois átomos de nitrogênio adjacentes (Figura 6) que pode ser encontrado em diversos compostos com atividades biológicas, incluindo antioxidantes (Ansari et al., 2017), antiinflamatórios, analgésicos, antineoplásicos, antivirais, antifúngicos (Faria et al., 2017) antidepressivos (Karrouchi et al., 2018) e leishmanicidas (Alam et al., 2015).

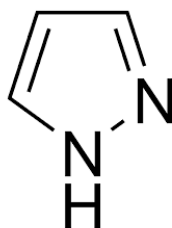


Figura 6. Estrutura química do anel pirazólico. Retirado de <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pyrazol.svg>. Acessado em: 23/05/2021.

Análogos de pirazol têm se destacado pela comprovada atividade contra diferentes bactérias patogênicas. Derivados de pirazol e imidazo[1,2-b]pirazol foram capazes de inibir 90% do crescimento de *Mycobacterium tuberculosis in vitro* (Meta et al., 2019), demonstrando grande potencial de análogos pirazólicos para o tratamento dos casos de tuberculose. Híbridos de pirazol-benzotiazol, contendo grupos doadores de elétrons, apresentaram ação dual com atividade contra *M. tuberculosis* e antioxidante (Bhat & Belagali 2018). Ainda, estudos apontam para a eficácia de derivados de pirazol contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), sugerindo que compostos híbridos contendo o núcleo bioativo do pirazol possam resultar em novos antibióticos com ação rápida e com baixos efeitos colaterais (Verma et al., 2021). O efeito microbicida dos derivados da cumarina-pirazol-carboxamida, um inibidor da topoisomerase II e IV, contra bactérias destrutivas foi maior que potentes antibióticos, como novobiocina e ciprofloxacina (Liu et al., 2018). Além disso, derivados de pirazol-1-carboxamida apresentaram efeito contra *S. aureus*, *Escherichia coli* e ainda, *Candida albicans*, demonstrando seu potencial bactericida e fungicida (Sharshira & Hamada 2011).

A atividade antimalárica, incluindo contra parasitos resistentes a artemisinina, também foi demonstrada pelos derivados de pirazolamida, cujo mecanismo de ação envolve a interrupção da regulação do gradiente de Na⁺ (Vaidya et al., 2014). Uma série de pirazol-pirazolina apresentou atividade antimalárica, incluindo cepas de *Plasmodium falciparum* sensíveis (CQ^S) e resistentes (CQ^R) a cloroquina (CQ) *in vitro* e *in vivo* (Kumar et al., 2018). Neste estudo, o tratamento de hemácias infectadas por *P. falciparum* (cepas CQ^S (3D7) e CQ^R (RKL-9)) com derivados de pirazol-pirazolina revelou potente atividade antiparasitária (IC₅₀ < 2 µM) comparado a CQ (IC₅₀ = 11,25 µM). O composto mais promissor (derivado 7o) reduziu em 89,42% a parasitemia de camundongos Suíços infectados com *P. berghei*, sugerindo que a otimização destes compostos possa gerar fármacos antimaláricos mais eficazes. Análogos de pirazolopirimidina, por exemplo, se destacam como derivados não quinolínicos que atuam como inibidores da enzima diidroorotato desidrogenase de *P. falciparum*, envolvida na reação redox da via metabólica da síntese de novo de nucleotídeos de pirimidina (Pinheiro et al., 2019). Ainda, derivados híbridos contendo pirazol-1,3,4-oxadiazol demonstraram eficácia antimalárica por inibição da maturação de esquizontes (Verma et al., 2019).

Diversos estudos demonstraram que derivados de pirazol também possuem ação contra tripanossomatídeos. Pirazol-3-5-dicarboxilatos simples e pirazolatos possuem atividade antiprotozoária contra *Leishmania (Leishmania) infantum*, *Leishmania (Vianna) braziliensis* e *T. cruzi*, apresentando efeito contra formas amastigotas intracelulares *in vitro* destes parasitos. Neste estudo, a eficácia dos análogos de pirazol foi superior ao glucantime e BZ, fármacos de referência para leishmaniose e DC, respectivamente, alcançando elevados índices de seletividade. Essa alta atividade tripanocida deve-se a capacidade inibitória desses compostos sobre a enzima superóxido dismutase dependente de ferro (Fe-SOD), essencial para o sistema de defesa antioxidante dos parasitos (Reviriego et al., 2017). Derivados de benzo[g]ftalazina à base de pirazol possuem atividade tripanocida contra amastigotas intracelulares e tripomastigotas de *T. cruzi*, sendo mais efetivos e menos tóxicos que o BZ nas duas fases da DC. Estes compostos também possuem a inibição da enzima Fe-SOD como mecanismo de ação (Sánchez-Moreno et al., 2011).

Ainda, o pirazolo-3,4-1,4-tiazepina, que possui como mecanismo de ação a inibição de citocromo P450 (CYP51), apresentou atividade *in vitro* contra formas amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, com IC₅₀ = 3,86 e 4,00 µM, respectivamente.

O híbrido pirazilo-tiazepina demonstrou eficácia parcial em modelo murino de infecção aguda por *T. cruzi* com redução de 43% da parasitemia (Fiuza et al., 2018). Outros análogos promissores, os derivados de N-etilureia-pirazóis demonstraram dupla atividade contra *T. brucei* e *T. cruzi* na faixa de concentração nanomolar, levando a parasitemia indetectável em modelo murino após 6 dias de tratamento, atuando como inibidor do metabolismo de CYP (Varghese et al., 2019).

Resultados recentes de nosso grupo revelaram que derivados de 5-amino-1-aryl-4-(4,5-di-hidro-1H-imidazol-2-il)-1H-pirazóis possuem atividade contra formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* (Monteiro et al., 2019). Os análogos mais efetivos ($IC_{50} \leq 10 \mu M$ e $IS > 10$) apresentaram propriedades de ligar ao sítio ativo de cruzipaina de *T. cruzi* e inibem a atividade de a cisteína protease deste parasito (Monteiro et al., 2019). Similarmente ao pirazol-imidazolina, o composto N-(1H-benzimidazol-2-il)-1,3-dimetil-pirazol-4-carboxamida (3H5), encontrado no PBD, também possui a inibição de cruzipaina como mecanismo de ação. Assim, este estudo teve enfoque no desenho racional de novos fármacos com a otimização do composto protótipo, pirazol-imidazolina, pela substituição do anel imidazolina pela carboxamida (séries 1 e 2), visando melhorar sua interação molecular com cruzipaina, a fim de promover uma inibição mais efetiva desta cisteína protease. O papel do grupo amino (NH₃), que pode interferir com a solubilidade da molécula, também foi avaliado nas séries 2 e 3. Ainda, as mudanças no composto protótipo foram realizadas visando avaliar a influência eletrônica e estéricas dos grupos substituintes na atividade tripanocida comparada ao composto protótipo. Assim, o grupo metila (CH₃), um grupamento eletrodoador, foi adicionado ao anel pirazol da molécula (série 4) ou no anel imidazolina (série 5). Desta forma, neste estudo novos compostos heterocíclicos derivados de pirazol foram sintetizados e avaliados quanto a eficácia contra *T. cruzi*, visando contribuir na área da química medicinal com novos potenciais candidatos para o tratamento da DC.

2. Justificativa

O cenário atual da DC com milhões de portadores crônicos sem tratamento eficaz, acarretando anos de vida perdidos por incapacidade produtiva, somado a globalização da doença, destaca a urgência da descoberta de novos fármacos seguros e efetivos para o combate à DC. O sucesso da vigilância entomológica, com o controle da transmissão vetorial por *Triatoma infestans*, e o controle de bancos de sangue nos países do Cone Sul reduziu a transmissão, mas a doença reemerge com surtos de infecção oral na América do Sul e se propaga principalmente por via congênita e transfusional em países não-endêmicos.

Poucos avanços foram alcançados na quimioterapia da DC devido à resultados insatisfatórios em ensaios clínicos de potenciais candidatos ao tratamento. Assim, o tratamento permanece pautado em nitroderivados (benzonidazol e nifutimox) que apresentam importantes limitações. A nova proposta da Organização Mundial da Saúde para o controle e eliminação de doenças negligenciadas (2021-2030) enfatiza, entre outros aspectos, a atenção à saúde do portador, identificação de biomarcadores e testes de diagnóstico sensíveis e, ainda, a identificação de novos fármacos por otimização de compostos ou reposicionamento. Este estudo está alinhado com o planejamento racional de compostos, com enfoque na classe do pirazol, e espera-se que as mudanças estruturais dos novos derivados potencializem a seletividade e atividade tripanocida.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar a atividade farmacológica de substâncias sintéticas derivadas de 1-aril-1H-pirazol-4-carboxamidas (séries 1 e 2) e 1-aril-3-metil-4-(4,5-di-hidro-1H-midazol-2-il)-1H-pirazóis (séries 3 a 5) sobre *Trypanosoma cruzi in vitro*.

3.2. Objetivos específicos

- I. Determinar a atividade e seletividade dos derivados de pirazol sobre formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*;
- II. Avaliar o efeito citotóxico dos derivados de pirazol em células de mamíferos;
- III. Analisar os parâmetros físico-químicos in silico dos derivados de pirazol;
- IV. Analisar a relação estrutura-atividade dos análogos de pirazol;
- V. Avaliar a propriedade ADMET in silico dos derivados de pirazol promissores;
- VI. Avaliar o efeito dos derivados de pirazol promissores na reversibilidade da infecção *in vitro* através de ensaios de *washout*;
- VII. Investigar a eficácia de derivados de pirazol promissores em modelo de cultivo 3D infectados por *T. cruzi*;
- VIII. Avaliar o efeito inibitório dos compostos sobre a atividade de cisteína protease.

4. Materiais e métodos

4.1. Reagentes

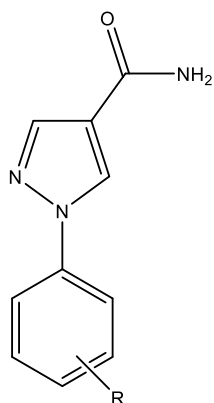
Ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), acetato de sódio (CH₃COONa), agarose, dimetilsulfóxido (DMSO), 4,6'-Diamidino-2'-fenilindol (DAPI), estreptomicina, L-glutamina, paraformaldeído (PFA), penicilina, peptídeo fluorogênico (cloridrato de 7-Amino-4-Metilcumarina, CBZ-L-Fenilalanil-L-Arginina amida; Z-FR-AMC), tampão fosfato-salino (PBS), Tris-HCl, glicerol, tripsina, Triton X-100, ditioneitol (DTT), transepoissuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)butano (E-64) foram adquiridos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Soro fetal bovino e meio RPMI 1400 foram obtidos da Cultilab S/A (Campinas, SP, Brasil). Kit CellTiter Glo® e D-Luciferina foram obtidos na Promega (Madison, WI, USA) e MedChemExpress (Princeton, NJ, USA), respectivamente.

4.2. Compostos sintéticos

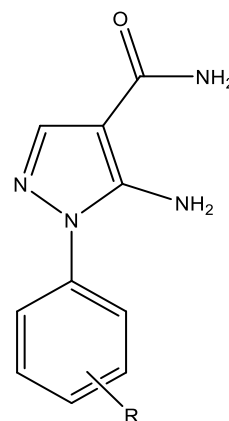
Os compostos sintéticos foram cedidos pelo Prof. Dr. Maurício dos Santos da Universidade Federal de Itajubá (UNIFEI). Modificações foram realizadas pela inserção de substituintes em diferentes posições no anel aromático. A purificação de todas as substâncias foi realizada através de recristalização e o grau de pureza > 99% foi determinado por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massas (CG-MS). Assim, foram geradas 5 séries de compostos:

Série 1 (1-*aril-1H*-pirazol-4-carboxamidas) e série 2 (5-amino-1-*aril-1H*-pirazol-4-carboxamidas): os derivados 1-*aril-1H*-pirazol-4-carboxamidas **1(a-m)** e 5-amino-1-*aril-1H*-pirazol-4-carboxamidas **2(a-m)** foram obtidos a partir dos intermediários 1-*aril-1H*-pirazol-4-carbonitrilas e 5-amino-1-*aril-1H*-pirazol-4-carbonitrilas, respectivamente, utilizando uma metodologia de hidrólise com ácido sulfúrico concentrado (98%), à temperatura ambiente, durante 90-120 minutos. Cada mistura obtida foi neutralizada com solução aquosa de hidróxido de sódio 2 mol.L⁻¹, o precipitado formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada.

Série 1

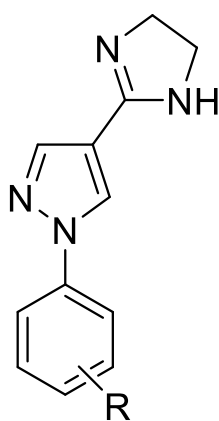


Série 2



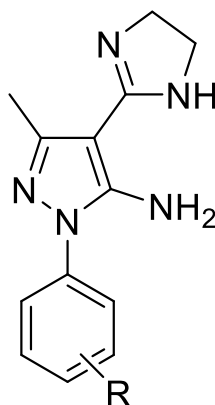
Esquema 1. Estrutura dos derivados 1-aryl-1*H*-pirazol-4-carboxamidas (série 1) e 5-amino-1-aryl-1*H*-pirazol-4-carboxamidas (série 2). R: H; 3-Cl; 2,4-diCl; 3,5-diCl; 4-Cl; 4-F; 3-F; 4-Br; 3-Br; 3-OCH₃; 2,3-diCl.

Série 3 (1-aryl-4-(4,5-di-hidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazóis): a síntese dos produtos 1-aryl-4-(4,5-di-hidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazóis **3(a-n)** foi feita a partir da reação envolvendo 1-aryl-1*H*-pirazol-4-carbonitrilas, 1,2-diaminoetano (etilenodiamina) e dissulfeto de carbono, via micro-ondas, com potência fixa de 50W, durante 20 minutos. A mistura reacional foi vertida em gelo com agitação, o sólido formado foi filtrado a vácuo e lavado com água gelada. Em alguns casos, foi necessário realizar um processo de recristalização utilizando uma mistura etanol/água em diferentes proporções.



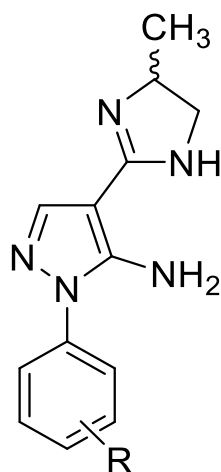
Esquema 2. Estrutura dos derivados 1-aryl-4-(4,5-di-hidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazóis (série 3). R: 3-Cl; 2,4-diCl; 2,6-diCl; 4-Cl; 4-F; 3-F; 4-Br; 3-Br; 4-OCH₃; 3-Cl, 4-CH₃; 4-Cl, 2-CH₃.

Série 4 (5-amino-1-*aryl*-3-metil-4-(4,5-di-hidro-1*H*-midazol-2-il)-1*H*-pirazóis): os produtos inéditos 5-amino-1-*aryl*-3-metil-4-(4,5-di-hidro-1*H*-midazol-2-il)-1*H*-pirazóis **4(a-c)** foram sintetizados a partir dos intermediários 5-amino-1-*aryl*-3-metil-1*H*-pirazol-4-carbonitrilas, 1,2-diaminoetano (etilenodiamina) e dissulfeto de carbono, utilizando refluxo por 12-14 horas. Após o término de cada reação, a mistura reacional foi vertida em água gelada e filtrada a vácuo. O sólido obtido foi recristalizado a partir de uma mistura etanol/água.



Esquema 3. Estrutura dos derivados 5-amino-1-*aryl*-3-metil-4-(4,5-di-hidro-1*H*-midazol-2-il)-1*H*-pirazóis (série 4). R: 3-Cl; 3,5-diCl; 3,4-diCl.

Série 5 (5-amino-1-*aryl*-4-(4-metil-4,5-di-hidro-1*H*-midazol-2-il)-1*H*-pirazóis): 5-amino-1-*aryl*-1*H*-pirazol-4-carbonitrilas **5(a-c)** reagiram com 1,2-diaminopropano e dissulfeto de carbono, empregando refluxo por 12-14 horas. Os produtos inéditos correspondentes, 5-amino-1-*aryl*-4-(4-metil-4,5-di-hidro-1*H*-midazol-2-il)-1*H*-pirazóis, foram obtidos como sólidos, após verter as respectivas misturas reacionais em água gelada e realizar a filtração a vácuo. Alguns produtos tiveram que ser purificados a partir do processo de recristalização usando uma mistura conveniente etanol/água.



Esquema 4. Estrutura dos derivados 5-amino-1-aryl-4-(4-metil-4,5-di-hidro-1*H*-midazol-2-il)-1*H*-pirazóis (série 5). R: R: 3-Cl; 3,5-diCl; 3,4-diCl.

4.3. Cultivo celular

4.3.1. Modelo bidimensional (2D)

4.3.1.1. Células VERO

Células VERO, células epiteliais provenientes de rim de macaco verde africano, foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ código 0245) e mantidas semanalmente no laboratório. As culturas, com cerca de 80 – 100% de confluência, foram lavadas por 3 vezes em solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline* – PBS: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄ anidro, 2 mM KH₂PO₄, pH 7,2), seguido de incubação (1 a 3 min, 37°C), com solução de tripsinização (0,025% de tripsina e 0,02% de EDTA em PBS). Posteriormente, cerca de 10 mL de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB, denominado meio RPMI suplementado, foi adicionado ao frasco de cultura para inativação da enzima e recolhimento das células isoladas. Em seguida, a suspensão celular foi sedimentada por centrifugação (620 × *g*, 10 min) e o sedimento ressuspensão em 5 a 10 mL de meio RPMI suplementado. Após determinação do número total de células/ml por contagem em câmara de Neubauer, as células foram semeadas na densidade de 6 × 10⁵ células em frascos de cultura de 150 cm². As culturas foram mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ e o meio nutritivo trocada a cada 2 dias.

As culturas de células VERO foram utilizadas para obtenção de formas tripomastigotas de *T. cruzi*, ensaio de citotoxicidade e atividade tripanocida sobre amastigotas intracelulares em modelo 2D e 3D.

4.3.2. Modelo tridimensional (3D)

Células VERO foram semeadas na densidade de 2×10^5 células/poço em placa de 96 poços de fundo U previamente revestidas com agarose (1%) e esterilizadas em luz UV por 24 h. As células foram cultivadas por 4 dias em meio RPMI 1640 suplementado (37 °C, 5 % CO₂), para completa formação do microtecido (Garzoni et al., 2008). O modelo de cultivo 3D foi empregado na análise de atividade tripanocida de compostos promissores.

4.4. Parasitos

Trypanosoma cruzi clone Dm28c geneticamente modificado para expressar o gene de luciferase (Dm28c-Luc), gentilmente cedido pela Dra. Cristina Henriques (Henriques et al., 2012), foi utilizado nos ensaios de triagem fenotípica. Formas tripomastigotas derivadas de cultivo celular foram obtidas de células VERO após 4 dias de infecção. As culturas foram infectadas na proporção de 5:1 parasitos/célula alvo e o meio nutritivo trocado após 24 h de infecção. Os tripomastigotas liberados no sobrenadante das culturas, após ruptura celular, foram recolhidos, centrifugados (800 × g, 15 min) e lavados em meio RPMI suplementado. Após lavagem, os parasitos foram ressuspensos em meio RPMI suplementado e o número de parasitos/mL determinado pela quantificação em câmara de Neubauer. Dm28c-Luc foi utilizado na análise de atividade tripanocida contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares (modelo 2D e 3D).

4.5. Ensaio de citotoxicidade

As células VERO foram semeadas ($1,5 \times 10^4$ células/poço) em placa de 96 poços branca de fundo chato e transparente. Após 24 h de cultivo, as culturas foram incubadas (72 h, 37°C) com diferentes concentrações dos derivados pirazólicos ou Bz

(1,95 – 500 μM). Ao término do tratamento, 20 μL da solução do Kit CellTiter Glo foi adicionada por poço, sob agitação, e a viabilidade celular foi medida pela quantificação de adenosina trifosfato (ATP) em leitor de luminescência (Glomax). Como controle negativo, as células VERO foram tratadas com meio RPMI 1640 suplementado contendo dimetilsulfóxido ($\leq 1\%$; DMSO). A concentração capaz de reduzir em 50% a viabilidade celular (CC_{50}) foi calculada por regressão linear. O mínimo de 3 ensaios independentes foi realizado em duplicata.

4.6. Atividade tripanocida

4.6.1. Efeito sobre formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Tripomastigotas do clone Dm28c-Luc ($1,5 \times 10^6$ parasitos/poço), ressuspensos em RPMI 1640 suplementado, foram transferidos para placa de 96 poços. Em seguida, 50 μl da diluição seriada (1:3) dos compostos foi adicionado aos poços, atingindo faixas de concentrações entre 0,04 a 100 μM . Após tratamento por 24 h a 37°C, os parasitos foram incubados (5 min a 37°C) com luciferina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$), substrato da enzima luciferase, e a leitura do sinal luminescente realizada em leitor Glomax (Promega). Como controles positivos e negativos da reação foi utilizada a curva de concentração do BZ (0,04 – 100 μM) e meio RPMI 1600 suplementado com 10% SFB na ausência e presença de DMSO (concentração $\leq 1\%$), respectivamente. Os valores de IC_{50} e IC_{90} (concentração capaz de reduzir em 50% e 90% o número de parasitos viáveis) foram calculados por regressão linear. O índice de seletividade (IS) foi determinado pelo cálculo do valor médio de $\text{CC}_{50}/\text{IC}_{50}$ dos compostos testados. O mínimo de três ensaios independentes foi realizado em duplicata.

4.6.2. Efeito tripanocida sobre amastigotas intracelular

Células VERO (modelo 2D), semeadas em placas de 96 poços na densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço, foram mantidas em estufa (37°C, 24 h) em meio RPMI 1640 suplementado. Em seguida, as culturas de células VERO foram infectadas com tripomastigotas clone Dm28c-Luc na proporção 10:1 parasito/célula alvo. Após 24 h de interação, as culturas foram lavadas 3x com PBS e incubadas ou não (72 h a 37°C)

com os derivados pirazólicos ou BZ na faixa de concentração de 0,04 – 100 μM . Ao término do tratamento, o meio nutritivo foi removido e as culturas incubadas (5 min a 37°C) com uma solução de luciferina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) em PBS. A leitura do sinal luminescente foi realizada em leitor Glomax. Meios RPMI 1640 contendo 10% SFB na ausência e presença de DMSO (concentração $\leq 1\%$) foram utilizados como controles negativos. O valor de IC_{50} e IC_{90} foi calculado com base na regressão linear.

Além disso, a eficácia dos compostos promissores contra *T. cruzi* ($\text{IC}_{50} \geq 10 \mu\text{M}$ e $\text{IS} > 10$) também foi avaliada em modelo de cultivo 3D de células VERO. Após formação dos microtecidos (4 dias), os esferoides foram infectados por 24h com *T. cruzi* Dm28c-Luc na proporção de 10:1 parasito/célula alvo. Após infecção, as culturas foram lavadas 3 vezes em meio nutritivo suplementado para retirada de parasitos extracelulares. Os esferoides infectados foram submetidos ao tratamento (72 h, 37°C) com os compostos promissores em concentração definida após determinação do CC_{50} e $\text{IC}_{50}/\text{IC}_{90}$, tal como o BZ. Ao final do tratamento, os sobrenadantes das culturas 3D foram removidos e 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de luciferina em PBS adicionado aos esferoides. Após agitação (2 min, 25 °C), a leitura da luminescência foi realizada no leitor Glomax.

Os microtecidos infectados tratados ou não com derivados pirazólicos também foram fixados (20 min, 4°C) em 4% paraformaldeído (PFA) em PBS e processados para detecção de DNA com o corante de dicloridrato de 4',6-Diamidino-2'-fenilindol (DAPI; 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os microtecidos foram observados por microscopia de fluorescência utilizando o microscópio Zeiss Axio Imager M2 equipado com sistema Apotome. As imagens foram adquiridas utilizando o software AxioVision da Zeiss. Um total de 3 ensaios foi realizado em sextuplicata.

4.7. Ensaio de reversibilidade (*washout*)

Monocamadas de células Vero infectadas com *T. cruzi* (24 h) foram tratadas por 72 h a 37 °C com os derivados de pirazol promissores na concentração de IC_{90} e 2 vezes a concentração de IC_{90} . Após sucessivas lavagens, as culturas foram mantidas por mais 72 h a 37 °C em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB na ausência do composto. Luciferina (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionada separadamente ao sobrenadante da cultura, previamente removido, e à monocamada celular. O sinal luminescente foi lido no leitor Glomax-Multi Detection (Promega Corporation, Madison, WI, EUA). Bz

(100 μ M) e DMSO ($\leq 1\%$) foram usados como controles de reação positivos e negativos, respectivamente.

4.8. Análise físico-química *in silico*

As estruturas moleculares das séries de derivados pirazólicos foram inseridas no software Datawarrior. Com auxílio de ferramentas disponíveis neste programa foi realizado o cálculo de parâmetros físico-químicos (lipofilicidade, massa molecular, número de anéis aromáticos, números de ligações rotacionáveis, números de doadores e aceptores de hidrogênio, TPSA e fração de carbonos sp^3). Ainda, a predição de biodisponibilidade oral, pela análise integrada de múltiplos parâmetros, foi avaliada com o programa SwissADME. A análise da relação estrutura atividade foi baseada nas alterações de posicionamento dos substituintes na estrutura de cada série de compostos e sua relação com a atividade tripanocida. Além disso, utilizando o programa Knime e banco de dados de moléculas (ChEMBL, Drugbank e BindingDB) foi realizada a análise de potenciais alvos por similaridade do composto mais efetivo.

4.9. Predição *in silico* de propriedades ADMET

Os compostos promissores foram submetidos à análise *in silico* dos parâmetros ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade) utilizando os programas Molinspiration (Disponível em: <http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>) e admetSAR (Disponível em: <http://lmmd.ecust.edu.cn:8000/predict/>). Estas ferramentas utilizam modelos QSAR (Quantitative-structure-activity relationship) que pode ser descrito como um método estatístico que utiliza base de dados de compostos ativos ao organismo humano e/ou a diversos outros organismos para desenvolver modelos que possam prever determinada atividade biológica ou propriedade de compostos baseados em sua estrutura química (revisto por Tropsha 2010).

4.10. Análise da atividade em cisteína proteases

Extrato total de tripomastigotas (Dm28c-Luc; 10^8 parasitos/ml) foram extraídas com tampão de lise (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 0.6 % Triton X-100). A atividade de cisteína proteases dos extratos proteicos (5 μ g) foi medida em tampão acetato (CH_3COONa 10 mM, pH 5,0 contendo 1 mM de ditioneitol (DTT), volume final de 100 μ L), usando substratos de peptídeo fluorogênico (30 μ M de cloridrato de 7-Amino-4-Metilcumarina, CBZ-L-Fenilalanil-L-Arginina amida (Z-FR-AMC). As amostras foram incubadas por 45 min a temperatura ambiente com os compostos e a variação nas unidades de fluorescência relativa foi monitorada com um espectrofotômetro SpectraMaxM2e (Molecular Devices) por 1 h na excitação de 370 nm e emissão em 460 nm. Os ensaios de inibição foram realizados por coincubação com diferentes concentrações (100 – 6.3 μ M) dos compostos (**3g**, **3j** e **3m**) e transepoissuccinil-L-leucilamido-(4-guanidino)butano (E-64) separadamente. Controle adicional foi realizado com baixa concentração (\leq 1%) de dimetilsulfóxido (DMSO). A atividade enzimática foi expressa em $\mu\text{mol min}^{-1}$ mg de proteína $^{-1}$ e a inibição da atividade em porcentagem relativa ao controle não tratado.

5. Resultados

5.1. Desenho racional dos compostos

Este estudo teve enfoque na otimização de um composto *hit* (5-amino-1-*aril*-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il) -1*H*-pirazol), previamente identificado pelo grupo (Monteiro et al., 2019), com propriedade de ligação à cruzipaina e capaz de inibir parcialmente (>50%) a atividade de cisteína protease de *T. cruzi*. A rota sintética proposta para os novos derivados de pirazol foi planejada de forma a apresentar baixo custo, reprodutibilidade e alto rendimento. Mudanças no composto *hit* foram projetadas com base no composto 3H5 (N-(1*H*-benzoimidazol-2-il)-1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-carboxamida), identificado no banco de dados de proteína (*Protein Data Bank* - PDB) como inibidor de cruzipaina. Considerando que a região contendo carboxamida (CO-NH₂) do composto 3H5 interage fortemente com o sítio ativo da cruzipaina (doi: 10.2210/pdb4W5B/pdb), o anel imidazolina do composto *hit* foi substituído pela carboxamida (séries 1 e 2), na tentativa de potencializar a inibição da cisteína protease e aumentar a atividade tripanocida. Além disso, a influência da subtração do substituinte 5-amino (séries 1 e 3) e da adição de 3-metil (séries 4 e 5) foi avaliada na atividade biológica dos derivados de pirazol. Além disso, grupos doadores e receptores de elétrons, incluindo halogênios, grupos metil e metoxi, foram inseridos em diferentes posições do anel benzeno visando modular as interações eletrostáticas dos novos derivados com o alvo (Figura 7).

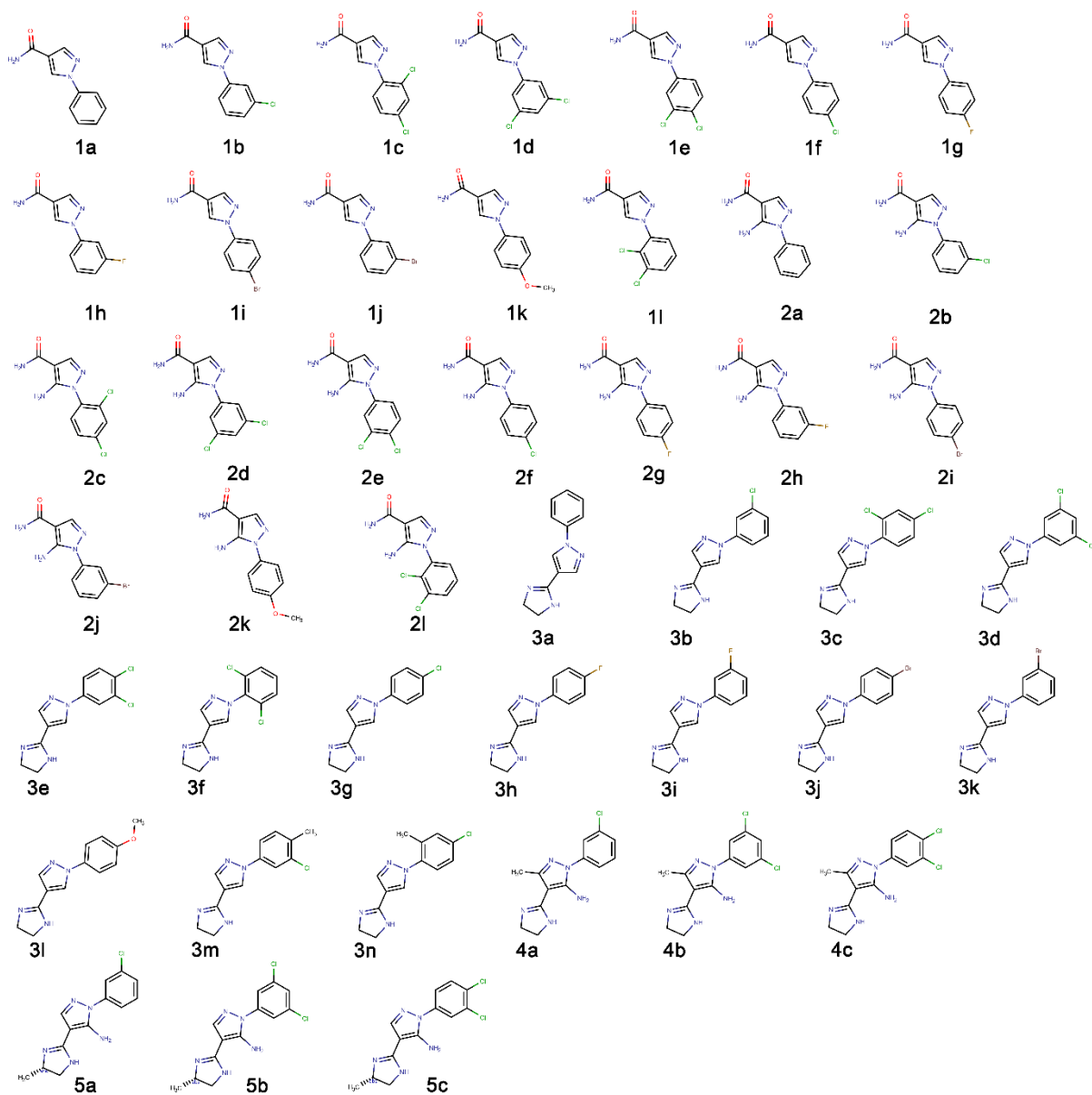


Figura 7. Estrutura dos derivados de pirazol. Pirazol-carboxamida, séries **1(a-l)** e **2(a-l)** e dos derivados de pirazol-imidazolina sem o grupo o amino (NH_2) no anel do pirazol, série **3(a-n)**, com adição do grupo amino e o substituinte metil no anel do pirazol, série **4(a-c)** e imidazolina, série **5(a-c)**.

5.2. Predição das propriedades físico-química dos derivados de pirazol

Nesta etapa do estudo, o perfil físico-químico dos derivados de pirazol (séries 1 a 5) foi avaliado visando selecionar compostos com boa biodisponibilidade oral para prosseguir nos ensaios de triagem fenotípica. Parâmetros como peso molecular (PM), lipofilicidade (LogP), número de átomos doadores (*Hydrogen bond donor* - HBD) e aceptores (*Hydrogen bond acceptor* - HBA) de ligação de hidrogênio, área de superfície polar topológica (tPSA), ligações rotacionais, número de anéis aromáticos e fração de carbonos sp^3 (F_{sp^3}) foram analisados utilizando o programa Datawarrior, SwissADME e o site FAF-drug4. A análise *in silico* revelou que todos os derivados de pirazol obedeciam a regra de Lipinski (PM <500, LogP <5, HBD <5, HBA <10 e tPSA <140 Å²; Ro5), sem qualquer violação. Os compostos apresentam uma pequena variação na PM entre os 44 análogos, possuindo intervalos de PM para a série 1 de $187,2 \leq PM \leq 266,09$, série 2 de $202,21 \leq PM \leq 281,11$, série 3 de $212,25 \leq PM \leq 291,15$ e séries 4 e 5 de $275,74 \leq PM \leq 310,18$ (Figura 8). Os derivados de pirazol possuem ótimas características de solubilidade e permeabilidade com valores de LogP entre 1 e 2,2, número de átomos doadores ($1 \leq HBD \leq 4$) e aceptores ($5 \leq HBA \leq 10$) de ligação de hidrogênio e área de superfície polar topológica (tPSA ≤ 96 Å²) que influenciam na absorção intestinal. Altos valores de HBA destacam no espaço químico os compostos com substituinte 4-OCH₃ (**1k**, **2k** e **3l**) dos *clusters* de seus análogos. Os compostos possuem 2 ou 3 anéis aromáticos, até 3 ligações rotacionais e fração de carbonos Sp^3 entre 0 e 0,23 (Figura 9).

Ainda, os compostos foram analisados segundo o gráfico de radar no programa SwissADME, que avalia a biodisponibilidade oral dos compostos com base no equilíbrio e integração de múltiplas propriedades físico-químicas de uma determinada molécula, incluindo tamanho, lipofilicidade, flexibilidade, polaridade, saturação e insolubilidade.

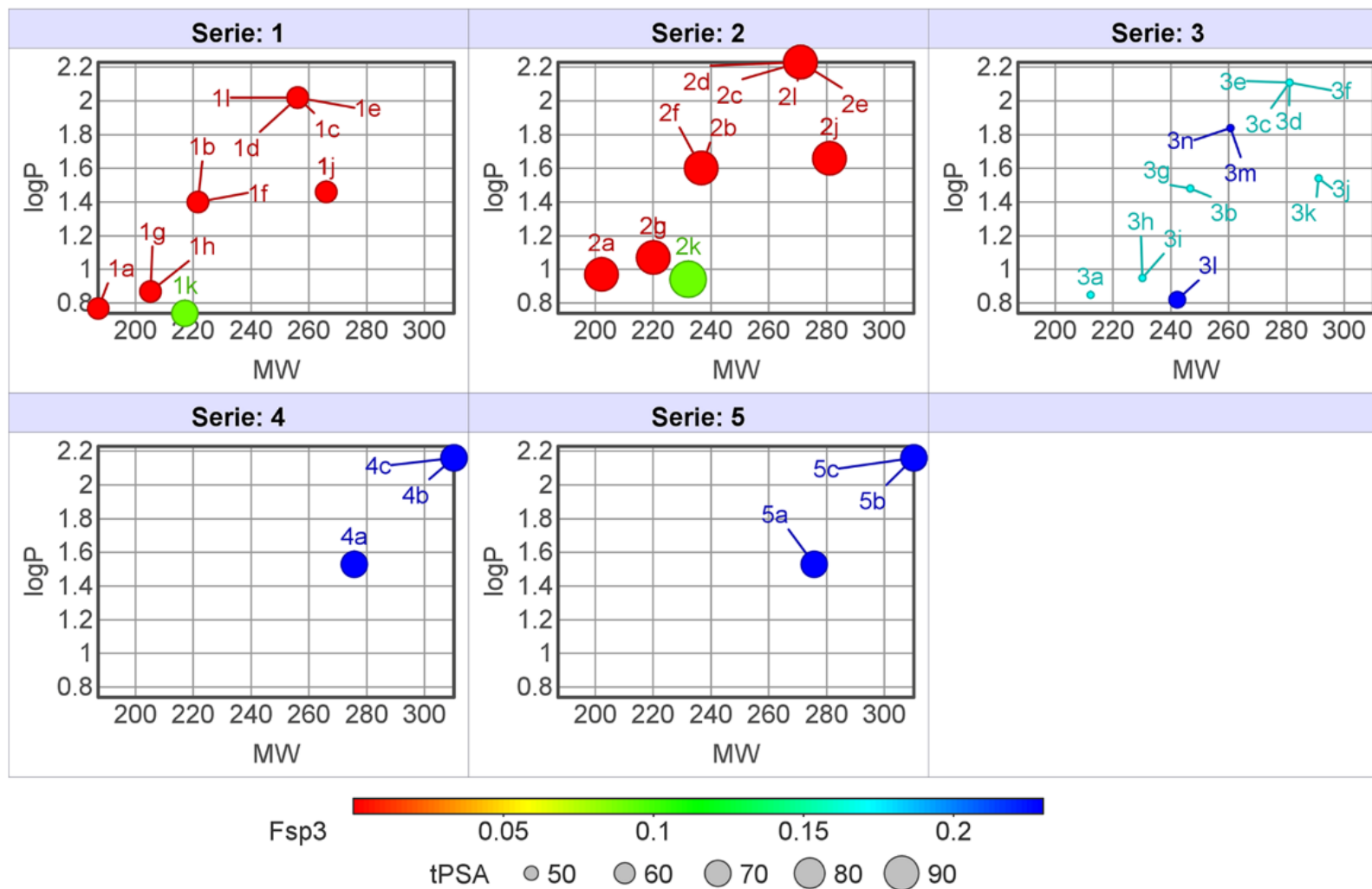


Figura 8. Análise das propriedades físico-químicas dos compostos das séries 1 a 5. Classificação dos compostos de acordo com o coeficiente de partição (LogP), peso molecular (*Molecular weight* -MW), fração de carbonos sp³ (Fsp³) e TPSA.

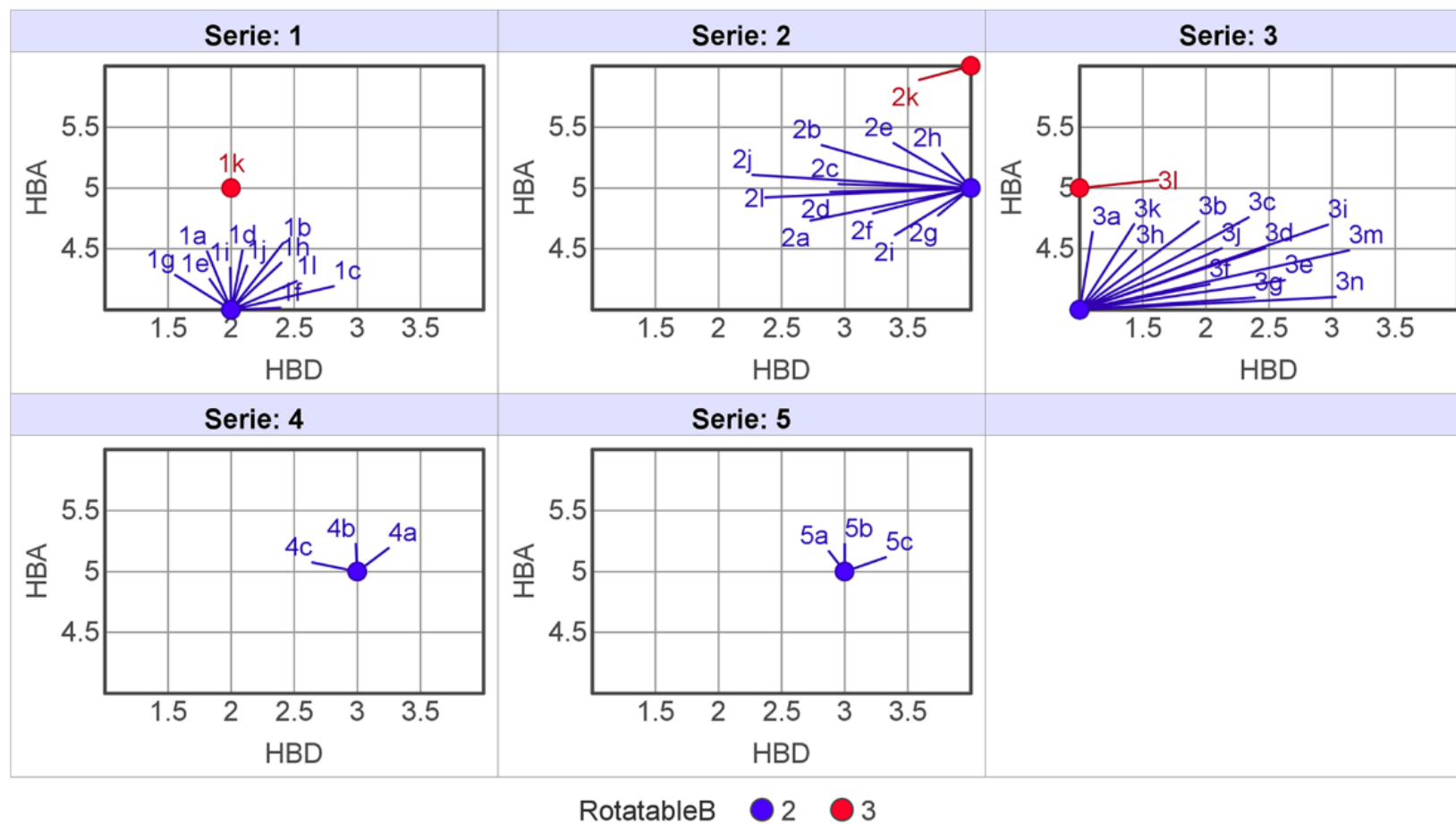


Figura 9. Análise das propriedades físico-químicas dos compostos das séries 1 a 5. Classificação dos compostos de acordo com o número de átomos doadores (*Hydrogen Bond Donor Counts* - HBD) e aceptores (*Hydrogen Bond Acceptor Counts* - HBA) de ligação de hidrogênio e número de ligações rotacionais (círculos azul ou vermelho).

Os resultados reforçam a predição de boa solubilidade e permeabilidade dos derivados de pirazol. Nesta análise, o padrão de excelência de biodisponibilidade oral é alcançado quando todos os parâmetros se encontram no interior da área rosada do gráfico. Assim, como pode ser observado nas figuras de 10 a 12, todos os compostos apresentam boa biodisponibilidade oral, uma vez que a maioria dos parâmetros, com exceção do perfil de saturação, se encontram no interior da área rosada. Neste contexto, os compostos **3m**, **3n**, **4(a-c)** e **5(a-c)** se destacam por apresentar o perfil mais próximo dos padrões ideais de excelência para biodisponibilidade oral (Figuras 10 e 12). Como esperado, os parâmetros físico-químicos analisados também apontam o BZ como fármaco com boa biodisponibilidade oral (Figura 11). Com base nos resultados positivos da triagem virtual, todos os compostos prosseguiram para os ensaios de triagem fenotípica.

Ressalta-se que no contexto das análises pelo programa SwissADME não foi constatado grupos funcionais e/ou subestruturas de alerta para compostos de interferência do ensaio Pan (*Pan-assay interference compounds* - PAINS) nos derivados de pirazol.

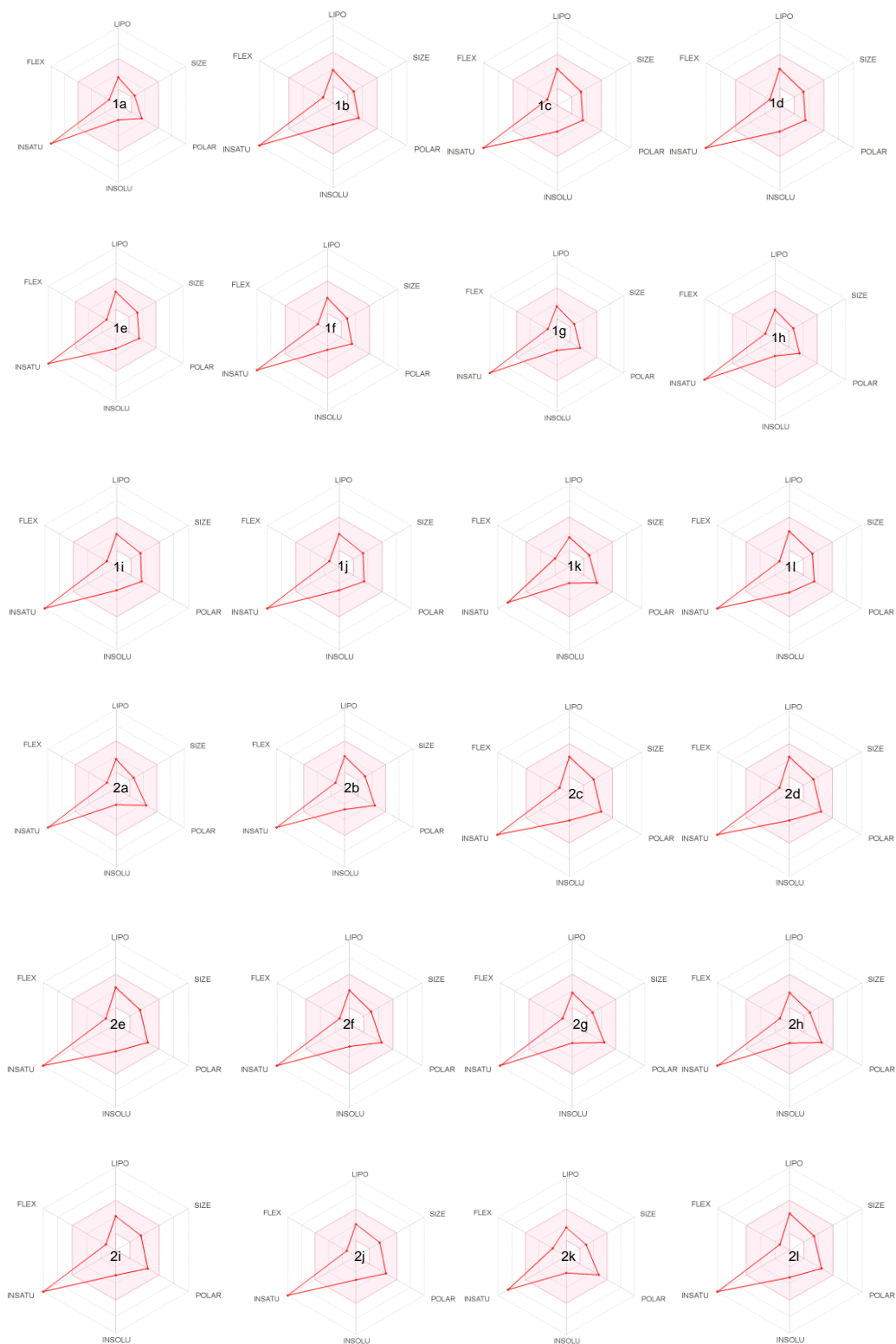


Figura 10. Gráfico radar de biodisponibilidade dos híbridos pirazol-carboxamida (séries 1 e 2). LIPO (lipofilicidade)= XLOGP3 entre -0,7 e +5,0; SIZE (tamanho da molécula)= entre 150 e 500 g/mol; POLAR (polaridade)= TPSA entre 20 e 130 Å²; INSOLU (insolubilidade)= LOG S <6; INSATU (saturação)= fração de carbono sp³ ≥0,25; FLEX (flexibilidade) ≤9 grupos rotáveis.

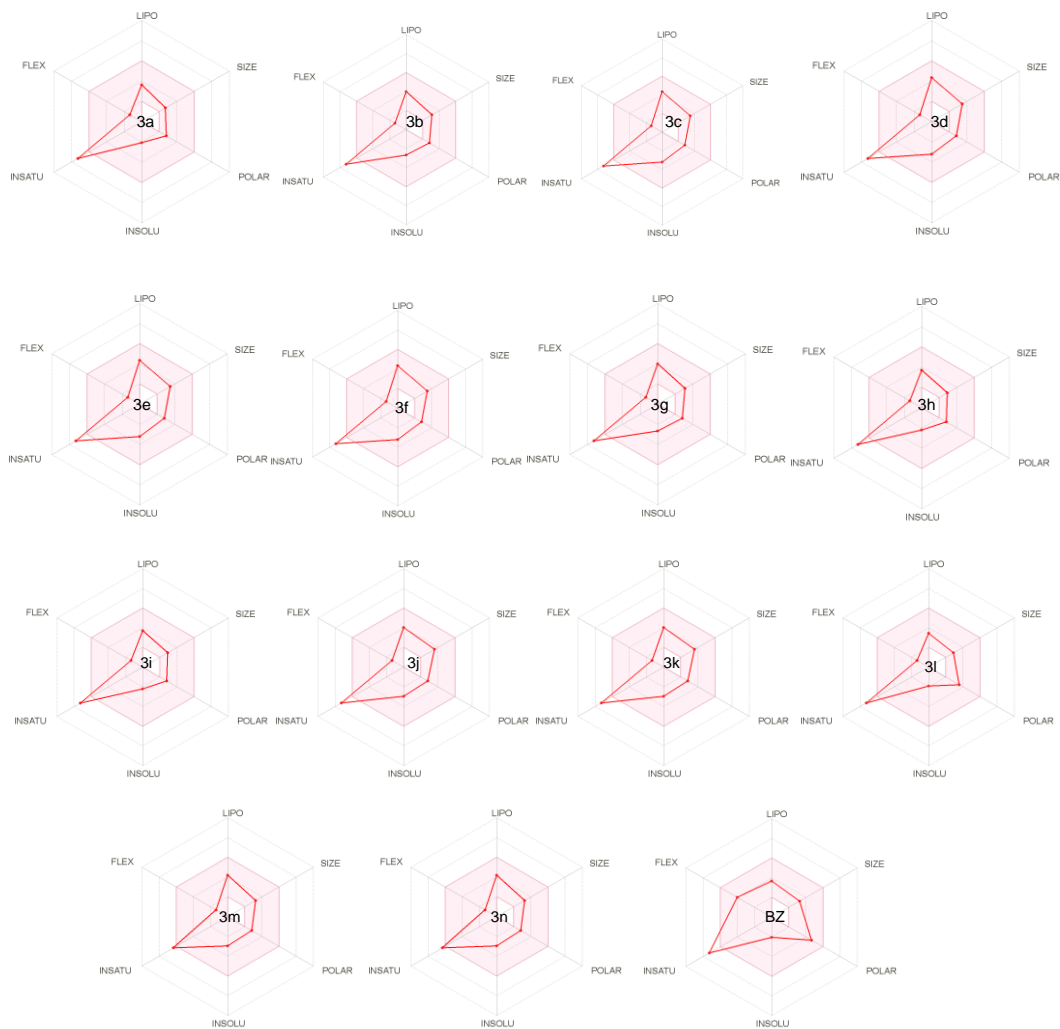


Figura 11. Gráfico radar de biodisponibilidade dos híbridos pirazol-imidazolina (série 3) e BZ. LIPO (lipofilicidade)= XLOGP3 entre -0,7 e +5,0; SIZE (tamanho da molécula)= entre 150 e 500 g/mol; POLAR (polaridade)= TPSA entre 20 e 130 Å²; INSOLU (insolubilidade)= LOG S <6; INSATU (saturação)= fração de carbono sp³ ≥0,25; FLEX (flexibilidade) ≤9 grupos rotáveis.

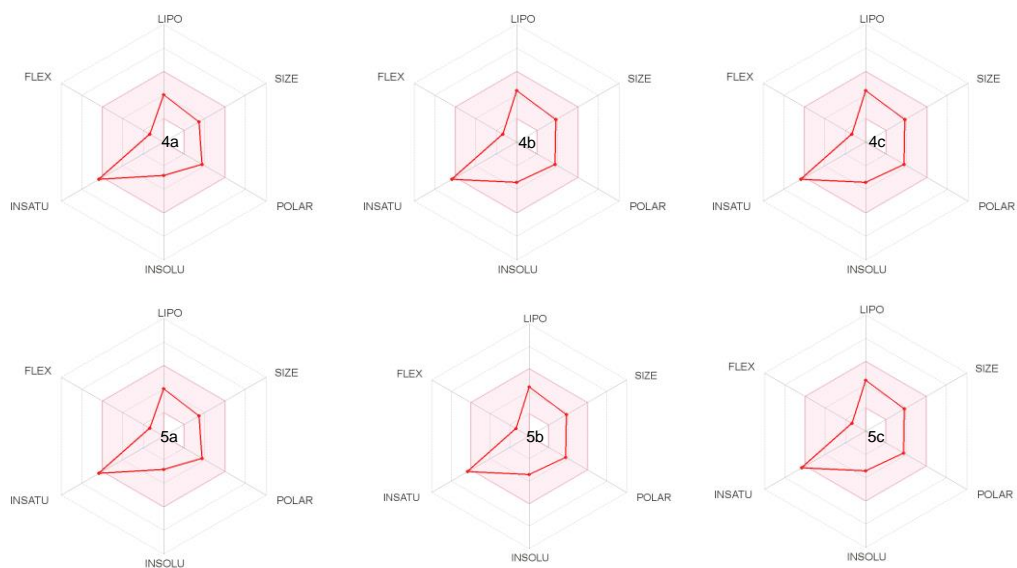


Figura 12. Gráfico radar de biodisponibilidade dos híbridos pirazol-imidazolina (séries 4 e 5). LIPO (lipofilicidade)= XLOGP3 entre -0,7 e +5,0; SIZE (tamanho da molécula)= entre 150 e 500 g/mol; POLAR (polaridade)= TPSA entre 20 e 130 Å²; INSOLU (insolubilidade)= LOG S <6; INSATU (saturação)= fração de carbono sp³ ≥0,25; FLEX (flexibilidade) ≤9 grupos rotáveis.

5.3. Citotoxicidade e efeito antiparasitário *in vitro*

A citotoxicidade dos diferentes derivados sobre células de mamíferos foi avaliada utilizando como modelo as células VERO. Após incubação (72 h) das monocamadas celulares com os derivados de pirazol na faixa de 15,62 a 500 μM , a viabilidade celular foi analisada pelo método de detecção de ATP. Os resultados revelaram baixa toxicidade dos derivados de pirazol. O valor de $\text{CC}_{50} > 500 \mu\text{M}$, similar ao BZ, foi evidenciado em 23% (10/44) dos compostos analisados e os demais análogos apresentaram valores de CC_{50} entre 160,51 e 479,66 μM (Tabela 1).

A análise da atividade tripanocida contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares foi realizada utilizando o clone Dm28c-Luc. Inicialmente, o efeito tripanocida dos derivados de pirazol foi avaliado contra tripomastigotas, perante a incubação (24 h) com diferentes concentrações dos compostos (0,04 – 100 μM). As análises de triagem fenotípica demonstraram que as séries de derivados de pirazol, séries **1(a-l)**, **2(a-l)**, **3(a-n)**, **4(a-c)** e **5(a-c)**, possuem baixa atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi* comparado ao BZ ($\text{IC}_{50} = 18,71 \pm 4,58 \mu\text{M}$), com apenas 11,4% (5/44) dos compostos com valor de $\text{IC}_{50} < 100 \mu\text{M}$ (Tabela 1). Entre os compostos analisados, o composto **3m** ($\text{IC}_{50} = 34,54 \pm 8,32 \mu\text{M}$) foi o mais ativo contra tripomastigotas (Tabela 1).

Para análise da atividade tripanocida em amastigotas intracelulares, células VERO infectadas com Dm8c-Luc foram tratadas (72 h) com os derivados de pirazol nas concentrações de 0,04 – 100 μM . Os resultados revelaram baixa atividade dos híbridos pirazol-carboxamida, séries **1(a-l)** e **2(a-l)**, contra amastigotas intracelulares, alcançando $\text{IC}_{50} > 50 \mu\text{M}$ (Tabela 1). A série **3(a-n)**, estruturalmente similar ao composto *hit* (híbrido pirazol-imidazolina) com ausência do grupo amino (NH_3), apresentou 43% (5/14) dos análogos com valor de $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{M}$. Destaca-se a atividade tripanocida de 3 análogos (**3g**, **3j** e **3m**) com $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{M}$ (Tabela 1). Os derivados **3j** ($\text{IC}_{50} = 2,75 \pm 0,62 \mu\text{M}$) e **3m** ($\text{IC}_{50} = 3,58 \pm 0,25 \mu\text{M}$) apresentaram valores de IC_{50} menores que o BZ ($\text{IC}_{50} = 4,67 \pm 0,22 \mu\text{M}$), fármaco de referência. A análise de eficácia dos derivados da série 3 revelou que 50% (7/14) dos análogos apresentaram valores de IC_{90} inferiores ao BZ ($\text{IC}_{90} > 100 \mu\text{M}$), com destaque para os compostos **3j** ($\text{IC}_{90} = 9,67 \pm 0,30 \mu\text{M}$) e **3m** ($\text{IC}_{90} = 21,37 \pm 1,25 \mu\text{M}$). Ressalta-se ainda, a alta seletividade dos compostos **3g**, **3j** e **3m**, alcançando índice de seletividade (IS) de 45,52, 112,48 e 44,83, respectivamente (Tabela 1). A inserção do

grupo metil no anel pirazol (**4(a-c)**) ou imidazolina (**5(a-c)**) resultou em perfil distinto de atividade contra os parasitos intracelulares, variando os valores de IC₅₀ entre 32,95 e 93,83 µM (Tabela 1) e, portanto, menos ativos que a série 3 e BZ. Dentro dos compostos ativos, os análogos **3g**, **3j** e **3m** foram identificados como os mais promissores contra *T. cruzi*.

5.4. Relação estrutura-atividade (SAR) dos derivados de pirazol

As séries **1(a-l)**, **2(a-l)**, **3(a-n)**, **4(a-c)** e **5(a-c)** foram sintetizadas visando a otimização do composto hit pela substituição do anel imidazolina por carboxamida (séries 1 e 2), remoção do grupo amino (série 3) e adição do grupo metil no anel pirazol (série 4) ou imidazolina (série 5). O perfil distinto de atividade dos derivados de pirazol (séries 1 a 5) contra amastigotas intracelulares destaca a importância da estrutura química da molécula na potência (pIC₅₀) dos compostos bioativos (Tabela 2). A análise de SAR demonstrou que a substituição do anel imidazolina do composto *hit* por carboxamida (séries 1 e 2) impactou na atividade tripanocida e resultou em queda da potência biológica (pIC₅₀ < 4,3) (Tabela 2). A subtração do grupo amino e adição de substituintes, como halogênios (Br, Cl e F) e grupos metil (CH₃) e metoxi (OCH₃), no anel benzeno (série 3) acarretou aumento diferencial na atividade biológica dos derivados pirazol-imidazolina (**3(b-n)**) em comparação ao derivado sem substituintes (**3a**; pIC₅₀ = 4,03). Análogos dissustituídos (**3(c-f)**) com substituintes de dicloro em C2 (2,4-Cl₂ e 2,6-Cl₂) e C3 (3,4-Cl₂ e 3,5-Cl₂) apresentaram baixa potência (4,09 ≤ pIC₅₀ ≤ 4,26). No entanto, a substituição do átomo de Cl por metil na posição *para* do composto 3,4-dicloro (**3e**), resultando no derivado 3-cloro-4-metil (**3m**; pIC₅₀ = 5,45), levou a uma atividade tripanocida 21 vezes maior que o derivado **3e** (pIC₅₀ = 4,12) (Tabela 2).

Table 1. Citotoxicidade e efeito tripanocida de derivados de pirazol

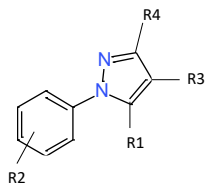
Compostos	Atividade tripanocida (média ± SD µM)						Citotoxicidade CC ₅₀ (média ± SD µM)
	Tripomastigotas			Amastigotas intracelulares			CC ₅₀
	IC ₅₀	IC ₉₀	IS	IC ₅₀	IC ₉₀	IS	
Serie 1 (a-l)	>100	Nd	Nd	>50	Nd	Nd	>500
Serie 2 (a-l)	>100	Nd	Nd	>70	Nd	Nd	>500
3a	>100	Nd	Nd	91,82 ± 2,03	>100	>5,44	>500
3b	>100	Nd	Nd	28,16 ± 1,81	86,60 ± 5,55	9,48	267,10 ± 28,15
3c	>100	Nd	Nd	56,64 ± 2,52	94,61 ± 3,61	7,21	408,69 ± 16,17
3d	66,30 ± 5,53	93,48 ± 1,56	5,78	54,91 ± 7,12	>100	6,99	383,83 ± 22,97
3e	64,86 ± 2,85	93,74 ± 0,73	7,39	76,52 ± 8,79	>100	6,26	479,66 ± 21,67
3f	>100	Nd	Nd	82,00 ± 2,52	>100	>6	>500
3g	64,60 ± 1,56	>100	4,27	6,09 ± 0,52	26,10 ± 14,31	45,52	277,24 ± 15,76
3h	>100	Nd	Nd	64,50 ± 3,81	>100	7,80	>500
3i	>100	Nd	Nd	64,12 ± 7,09	>100	7,80	>500
3j	57,71 ± 3,14	95,32 ± 5,43	5,36	2,75 ± 0,62	9,67 ± 0,30	112,48	309,33 ± 34,31
3k	>100	Nd	Nd	26,92 ± 2,19	72,85 ± 3,67	7,84	211,04 ± 31,68
3l	>100	Nd	Nd	71,76 ± 2,71	>100	>7	>500
3m	34,54 ± 8,32	>100	4,64	3,58 ± 0,25	21,37 ± 1,25	44,83	160,51 ± 16,13
3n	>100	Nd	Nd	24,68 ± 3,42	85,72 ± 5,03	13,86	342,17 ± 29,99
4a	>100	>100	Nd	>100	>100	>5	>500
4b	>100	>100	Nd	90,67 ± 13,17	>100	>5,51	>500
4c	>100	>100	Nd	93,83 ± 16,40	>100	3,78	355,4 ± 17,72
5a	>100	>100	Nd	>100	>100	Nd	>500
5b	>100	>100	Nd	32,95 ± 8,84	>100	>15,17	>500
5c	>100	>100	Nd	34,33 ± 4,24	>100	>9,98	342,93 ± 37,0
Bz	18,71 ± 4,58	>100	>26,7	4,67 ± 0,22	>100	>107	>500

Valores médios de IC₅₀ e IC₉₀ de três experimentos independentes ± desvio padrão (DP); IC₅₀: Concentração que inibe a proliferação do parasito em 50%; CC₅₀: Concentração que reduz a viabilidade das células Vero em 50%; Nd = Não determinado; Índice de seletividade (IS) = CC₅₀ de células Vero/IC₅₀ de formas tripomastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

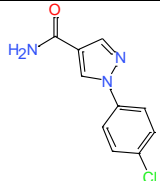
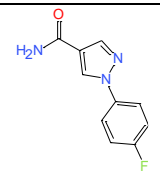
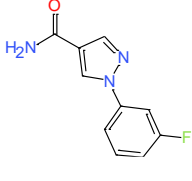
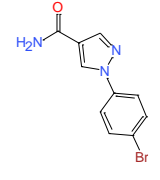
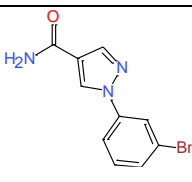
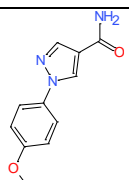
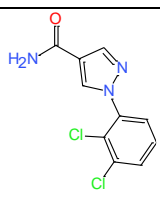
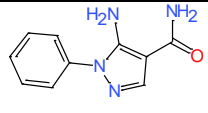
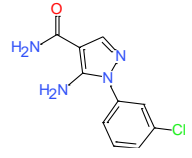
Melhora da atividade também foi evidenciada quando o átomo de Cl foi substituído pelo grupo metil na posição *orto* do derivado 2,4 dicloro (**3c**; pIC₅₀ = 4,25), originando o composto 2-metil-4-cloro (**3n**; pIC₅₀ = 4,61). O átomo de Cl na posição *orto* parece modular negativamente a atividade tripanocida (Tabela 2). O composto **3f** (2,6-dicloro), por exemplo, mostrou uma queda ainda maior na potência (pIC₅₀ = 4,09), consistente com a observação acima mencionada de que C-2 é um local subótimo para substituição. Perda da atividade biológica foi evidenciada em derivados fluorados em C4 (**3h**) e C3 (**3i**), ambos compostos com valor de pIC₅₀ de 4,19. A adição do grupo metoxi em C4 (**3l**) também resultou em perda da atividade (pIC₅₀ = 4,14). Por outro lado, a inserção Cl e Br na posição *para* do anel benzeno, derivados **3g** (pIC₅₀ = 5,22) e **3j** (pIC₅₀ = 5,56), respectivamente, resultou em aumento substancial da atividade tripanocida (Tabela 2). Em contraste, a mudança de Cl (**3b**) e Br (**3k**) para a posição *meta* reduziu em aproximadamente 10 e 5 vezes, respectivamente, a atividade tripanocida comparado aos análogos **3g** e **3j**, respectivamente (Tabela 2). Assim, somente as mudanças estruturais dos derivados **3g**, **3j** e **3m**, com introdução dos substituintes majoritariamente na posição *para* do anel benzeno, induziram aumento substancial da atividade tripanocida, com valores de potência similar ao BZ (pIC₅₀ = 5,33).

Seis análogos foram preparados com a inserção do grupo metil no anel do pirazol (**4(a-c)**) ou imidazolina (**5(a-c)**) contendo os substituintes 3-Cl, 3,5- e 3,4-dicloro com base na boa atividade dos derivados clorados, principalmente diclorados, do composto hit (5-amino-1-*aril*-4-(4,5-dihidro-1H-imidazol-2-il)-1H-pirazol). A introdução do grupo metil nos compostos 5-amino-pirazol-imidazolina não resultou em efeito benéfico para atividade tripanocida. Os compostos com adição de metil no anel pirazol mostrou uma diminuição ainda maior da potência com valores de pIC₅₀ de aproximadamente 4 (Tabela 2).

Tabela 2. Análise de relação estrutura-atividade (SAR) dos derivados de pirazol (séries de pirazol-carboxamida e pirazol-imidazolina).

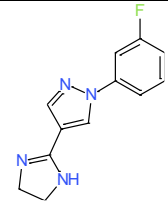
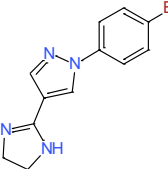
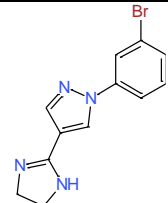
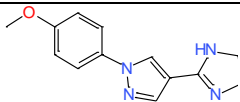
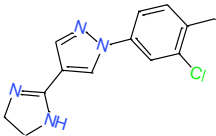
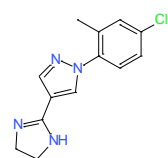
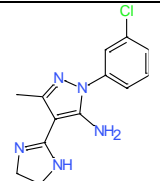
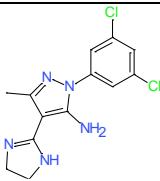
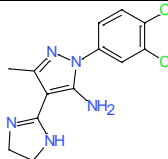


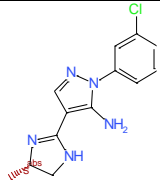
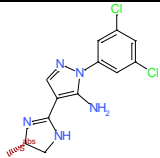
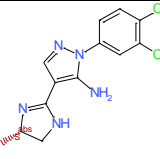
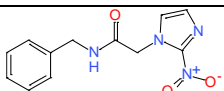
Compostos	Estrutura	R1	R2	R3	R4	Amastigotas
						intracelulares
						pIC ₅₀
1a		H	H	CO-NH2	H	<4,3
1b		H	3-Cl	CO-NH2	H	<4,3
1c		H	2,4-diCl	CO-NH2	H	<4,3
1d		H	3,5-diCl	CO-NH2	H	<4,3
1e		H	3,4-diCl	CO-NH2	H	<4,3

1f		H	4-Cl	CO-NH ₂	H	<4,3
1g		H	4-F	CO-NH ₂	H	<4,3
1h		H	3-F	CO-NH ₂	H	<4,3
1i		H	4-Br	CO-NH ₂	H	<4,3
1j		H	3-Br	CO-NH ₂	H	<4,3
1k		H	3-OCH ₃	CO-NH ₂	H	<4,3
1l		H	2,3-diCl	CO-NH ₂	H	<4,3
2a		NH ₂	H	CO-NH ₂	H	<4,15
2b		NH ₂	3-Cl	CO-NH ₂	H	<4,15

2c		NH2	2,4-diCl	CO-NH2	H	<4,15
2d		NH2	3,5-diCl	CO-NH2	H	<4,15
2e		NH2	3,4-diCl	CO-NH2	H	<4,15
2f		NH2	4-Cl	CO-NH2	H	<4,15
2g		NH2	4-F	CO-NH2	H	<4,15
2h		NH2	3-F	CO-NH2	H	<4,15
2i		NH2	4-Br	CO-NH2	H	<4,15
2j		NH2	3-Br	CO-NH2	H	<4,15
2k		NH2	4-OCH3	CO-NH2	H	<4,15

2l		NH2	2,3-diCl	CO-NH2	H	<4,15
3a		H	H	C3H6N2	H	4,03
3b		H	3-Cl	C3H6N2	H	4,55
3c		H	2,4-diCl	C3H6N2	H	4,25
3d		H	3,5-diCl	C3H6N2	H	4,26
3e		H	3,4-diCl	C3H6N2	H	4,12
3f		H	2,6-diCl	C3H6N2	H	4,09
3g		H	4-Cl	C3H6N2	H	5,22
3h		H	4-F	C3H6N2	H	4,19

3i		H	3-F	C ₃ H ₆ N ₂	H	4,19
3j		H	4-Br	C ₃ H ₆ N ₂	H	5,56
3k		H	3-Br	C ₃ H ₆ N ₂	H	4,57
3l		H	4-OCH ₃	C ₃ H ₆ N ₂	H	4,14
3m		H	3-Cl, 4-CH ₃	C ₃ H ₆ N ₂	H	5,45
3n		H	2-CH ₃ 4-Cl,	C ₃ H ₆ N ₂	H	4,61
4a		NH ₂	3-Cl	C ₃ H ₆ N ₂	CH ₃	<4
4b		NH ₂	3,5-diCl	C ₃ H ₆ N ₂	CH ₃	4,04
4c		NH ₂	3,4-diCl	C ₃ H ₆ N ₂	CH ₃	4,03

5a		NH2	3-Cl	C3H6N2	H	<4
5b		NH2	3,5-diCl	C3H6N2	H	4,48
5c		NH2	3,4-diCl	C3H6N2	H	4,46
BZ		-	-	-		5,33

Os valores relatados possuem valor máximo de desvio padrão de $\pm 0,75$ com base em pelo menos 3 ensaios experimentais ($n \geq 3$).

5.5. Efeito da atividade dos compostos na reversibilidade da infecção

Nesta etapa do trabalho foi oportuno avaliar se a atividade tripanocida dos compostos promissores é sustentável, ou seja, se é capaz de eliminar os parasitos. Assim, o ensaio de reversibilidade (*washout*) foi utilizado como estratégia de acompanhamento da recrudescência do parasitismo. Nesta abordagem, as culturas de células VERO infectadas (Dm28c-Luc) foram tratadas por 72 h nas concentrações de IC₉₀ e 50 µM dos compostos promissores (**3g**, **3j** e **3m**) e, após lavagem da monocamada, as culturas permaneceram por mais 72 h em cultivo na ausência dos compostos. As monocamadas celulares e seus sobrenadantes foram analisados separadamente quanto a presença de parasitos viáveis após adição de luciferina. Os resultados mostraram claramente uma redução significativa na carga parasitária das monocamadas celulares tratadas, na concentração de IC₉₀, com os derivados **3g**, **3j** e **3m**, alcançando uma diminuição de 4,5 x, 1,9 x e 8,7 x, respectivamente, quando comparados com as culturas infectadas sem tratamento (Figura 13). Na concentração de IC₉₀, os compostos promissores não foram efetivos no controle da infecção (Figura 13). Baixa intensidade de luminescência foi evidenciada no sobrenadante das culturas de células VERO infectadas e tratadas com os derivados promissores (Figura 13), demonstrando uma redução significativa de parasitos viáveis comparado às culturas sem tratamento. Observações adicionais dos sobrenadantes das culturas tratadas indicaram poucos tripomastigotas viáveis (dados não mostrados).

No entanto, o tratamento das culturas com 50 µM (2 a 5 vezes que o valor do IC₉₀) dos compostos promissores revelou a eficácia do derivado **3m**, que apresentou o mesmo perfil de atividade do BZ aplicado em uma concentração 2 vezes maior (100 µM) (Figura 13). O composto **3m** (50 µM) foi efetivo na eliminação dos amastigotas intracelulares e, tal como BZ (100 µM), a leitura do sinal luminescente revelou ausência de parasitos no sobrenadante das culturas (Figura 13). Não foram observados tripomastigotas no sobrenadante por microscopia de contraste de fase (dados não mostrados).

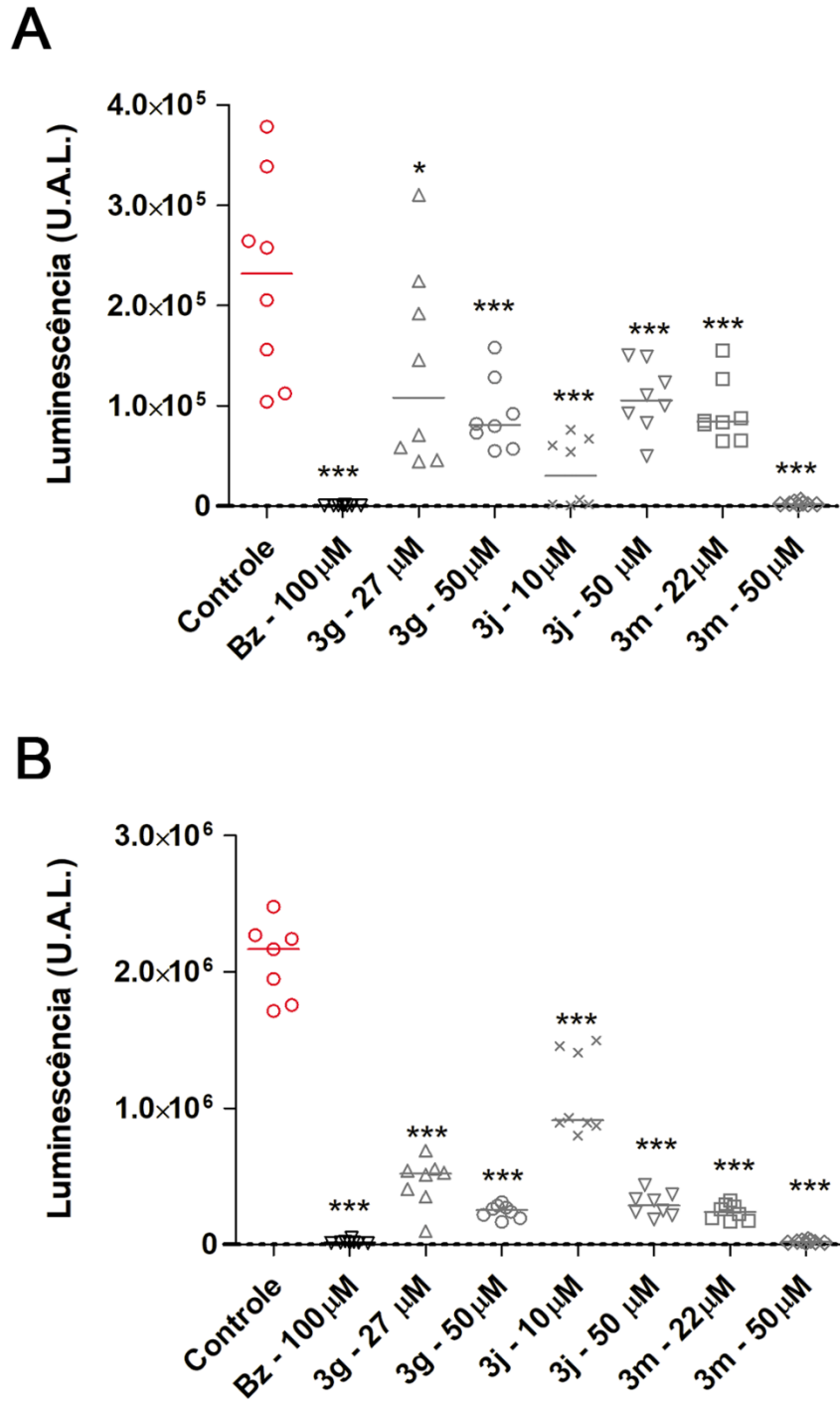


Figura 13. Inibição da reversibilidade da infecção *in vitro*. Os resultados foram demonstrados como unidade arbitrária de luminescência (UAL), das culturas de células VERO infectadas com *T. cruzi* e posteriormente tratadas com os derivados de pirazol promissores (**3g**, **3j** e **3m**) e BZ, utilizando concentrações de IC₉₀ ou 50 µM. (A) Perfil de liberação de parasitos viáveis (tripomastigotas) no sobrenadante das culturas. (B) Perfil de infecção das monocamadas celulares. (*) Estatisticamente significativo em relação ao grupo não tratado usando o teste One-Way ANOVA, sendo p<0,05 (*) e p<0,001 (***)

5.6. Eficácia dos compostos promissores no modelo 3D

As células VERO foram utilizadas para formação dos esferoides multicelulares ou microtecidos. O cultivo das células VERO em placa revestidas com agarose (4 dias, 37°C) inibiu a adesão das células isoladas ao substrato, favorecendo a interação intercelular tridimensionalmente em suspensão e formação de pequenos agregados celulares. Com o avanço do tempo de cultivo, os agregados celulares aumentaram de tamanho, devido a proliferação celular, e após 4 dias de cultivo os esferoides já apresentavam uma superfície mais uniforme e coesa (Figura 14).

Os esferóides de células VERO infectados com *T. cruzi* Dm28c-Luc foram incubados (72 h) com os derivados **3g**, **3j** e **3m** na concentração de 100 µM. O perfil de infecção dos microtecidos foi avaliado qualitativamente por microscopia de fluorescência após coloração com DAPI (corante de DNA). Ninhos de amastigotas intracelulares foram visualizados em diferentes regiões do microtecido (Figura 14). Alto nível de infecção foi observado nas camadas celulares mais externas dos esferoides, mas ninhos de amastigotas também foram visualizados em domínios mais internos do microtecido (Figura 14). Uma drástica redução na infecção do microtecido foi evidenciada com todos os derivados analisados, tal como observado com o BZ (Figura 14). Raros parasitos são observados nos microtecidos tratados com BZ assim como, no tratamento com os derivados **3g**, **3j** e **3m** (Figura 14).

Os dados quantitativos da intensidade de luminescência, mensurados após adição do substrato luciferina e representados como unidade arbitrária de luminescência (UAL), revelaram alta carga parasitária nos microtecidos infectados sem tratamento (UAL_{média}= 168.420) (Figura 15). Redução significativa da viabilidade dos parasitos intracelulares foi revelada com os derivados **3g** (UAL_{média}= 37.764), **3j** (UAL_{média}= 39.633) e **3m** (UAL_{média}= 13.567) comparado ao controle sem tratamento, alcançando uma inibição máxima de 92% (derivado **3m**) da viabilidade de amastigotas intracelulares (Figura 15). Dentre os compostos analisados, destaca-se novamente o composto **3m** como mais eficaz também em microtecidos, com perfil de atividade tripanocida similar ao BZ (UAL_{média}= 16.911) (Figura 15).

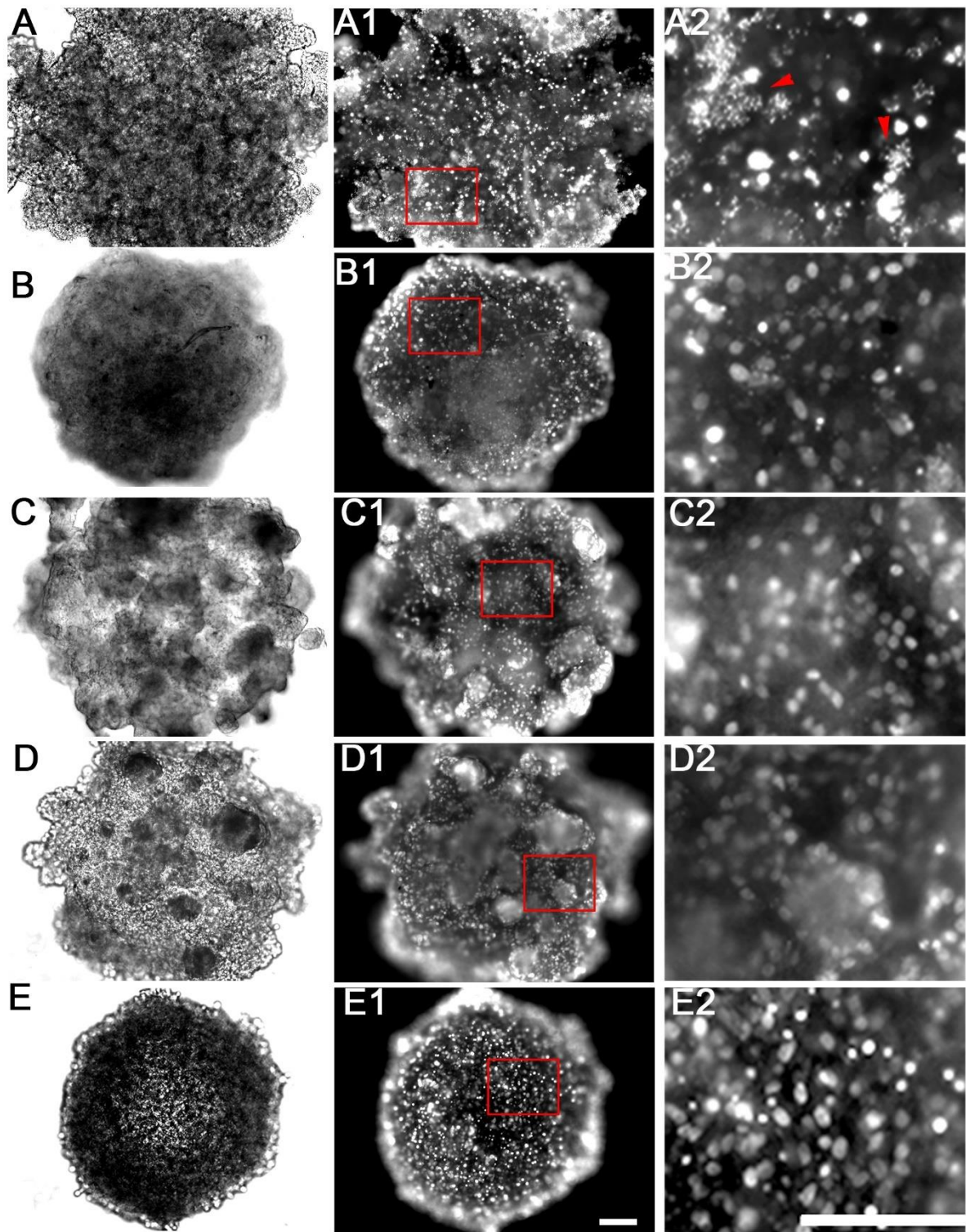


Figura 14. Efeito tripanocida dos derivados **3g**, **3j** e **3m** no microtecido. Imagens de microscopia de campo claro dos esferoides de células VERO infectados com *T. cruzi* (Dm28c-Luc) sem tratamento (A), tratados com BZ (B) ou com os derivados de pirazol-imidazolina (C - E). (A - A2) Controle (sem tratamento), (B - B2) BZ, (C - C2) composto **3g**, (D - D2) composto **3j**, (E - E2) composto **3m**. Imagens de fluorescência dos esferoides corados com DAPI, corante de DNA (A1 - E2). Ampliação da região do esferoide marcada em vermelho (inserto). Note a presença de ninhos de amastigotas no controle (cabeça de seta). Barra = 10 μ m

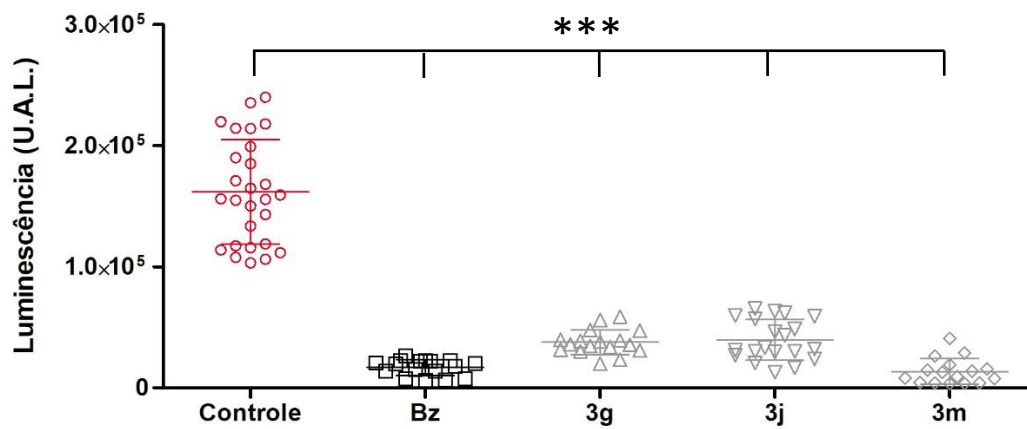


Figura 15. Atividade biológica dos derivados **3g**, **3j** e **3m** no microtecido. Determinação da viabilidade dos parasitos intracelulares pela atividade da enzima luciferase (sinal luminescente). UAL – Unidade arbitrária de luminescência. (*) Estatisticamente significativa em relação ao grupo não tratado usando o teste One-Way ANOVA, sendo $p < 0,001$ (***)

5.7. Propriedades ADMET dos compostos promissores

A farmacocinética de xenobióticos é dependente do fenômeno ADMET (absorção, distribuição, metabolismo, excreção e transporte). Assim, considerando os compostos **3g**, **3j** e **3m**, que apresentaram boa atividade contra amastigotas intracelulares ($IC_{50} < 10 \mu M$) e eficácia similar ao BZ no microtecido, como candidatos promissores a prosseguir para ensaios farmacocinéticos e pré-clínicos *in vivo*, seus parâmetros ADMET foram analisados *in silico* (Tabela 3). Os compostos **3g**, **3j** e **3m** apresentaram um perfil ADMET similar com poucas peculiaridades. Quanto a absorção, todos os derivados apresentaram perfil de absorção favoráveis, demonstrando boa absorção no epitélio intestinal, células Caco-2 e barreira hematoencefálica, com predição de boa biodisponibilidade oral (Tabela 3), compatível com os dados de propriedades físico-química. Ainda, os derivados **3g** e **3m** possuem previsão de localização mitocondrial enquanto o derivado **3j** pode ser acumulado em lisossomos.

De forma geral, os derivados não são inibidores promíscuos de enzimas do citocromo P450 (CYP450), mas inibe a isoenzima CYP1A2, que contribui fortemente no metabolismo de fármacos. O derivado **3m** destaca-se pela probabilidade de ser substrato da glicoproteína P (gp-P), bomba de efluxo de xenobióticos localizada na membrana plasmática, e CYP3A4 (Tabela 3). Como substrato de gp-P e CYP3A4, o derivado **3m** pode modular como inibidor ou indutor a atividade deste constituinte da família de transportadores ABC (gp-P) e da isoenzima CYP3A4.

O perfil de toxicidade dos compostos promissores também é bastante favorável. Os derivados **3g**, **3j** e **3m** não são carcinogênicos, não induzem mutagenicidade de AMES, mas possuem predição de hepatotoxicidade e de inibição de hERG (canais de potássio dependentes de voltagem tipo hERG), podendo acarretar distúrbios na condução elétrica do coração (Tabela 3).

Tabela 3. Análise ADMET *in silico* dos derivados pirazol-imidazolina (**3g**, **3j** e **3m**) e BZ.

Propriedades		Compostos							
		BZ		3g		3j		3m	
Absorção	Absorção Intestinal Humana	+	0,95	+	0,99	+	0,99	+	1,00
	Caco-2	+	0,74	+	0,89	+	0,83	+	0,82
	Barreira hematoencefálica	+	0,98	+	0,99	+	0,99	+	0,99
	Biodisponibilidade oral humana	+	0,73	+	0,87	+	0,84	+	0,83
Distribuição	Localização subcelular	Mitocôndria 0,77		Mitocôndria 0,38		Lisossomo 0,40		Mitocôndria 0,47	
Metabolismo	Inibidor da glicoproteína P	-	0,96	-	0,94	-	0,95	-	0,95
	Substrato de glicoproteína P	-	0,80	-	0,70	-	0,63	+	0,61
	Substrato CYP3A4	-	0,51	+	0,55	-	0,53	+	0,58
	Substrato CYP2C9	-	0,78	-	1,00	-	1,00	-	0,79
	Substrato CYP2D6	-	0,91	-	0,90	-	0,89	-	0,91
	Inibição de CYP3A4	-	0,82	-	0,93	-	0,88	-	0,88
	Inibição de CYP2C9	-	0,90	-	0,67	-	0,66	-	0,66
	Inibição de CYP2C19	-	0,82	-	0,69	-	0,71	-	0,59
	Inibição de CYP2D6	-	0,92	-	0,82	-	0,85	-	0,75
	Inibição de CYP1A2	-	0,80	+	0,88	+	0,88	+	0,88
Promiscuidade inibitória de CYP	-	0,58	-	0,66	-	0,56	-	0,54	
Toxicidade	Carcinogenicidade (binária)	-	0,83	-	0,89	-	0,89	-	0,87
	Carcinogenicidade (trinária)	Atenção	0,41	Não	0,50	Não	0,48	Não	0,55
	Mutagênese de Ames	+	0,93	-	0,79	-	0,77	-	0,80
	Inibição de hERG	-	0,65	+	0,76	+	0,76	+	0,81
	Hepatotoxicidade	+	0,73	+	0,88	+	0,65	+	0,63
	Toxicidade Oral Aguda	III	0,60	III	0,59	III	0,60	III	0,58

Predições com base em: admetSAR (<http://lmmd.ecust.edu.cn:8000>). A toxicidade oral aguda de compostos foi classificada com base no critério da EPA (agência de proteção ambiental dos EUA). Classe II - LD50 entre 50 mg/kg e 500 mg/kg; classe III - LD50 entre 500 mg/kg a 5000 mg/kg.

5.8. Efeito inibitório da atividade de cisteína protease

Na continuidade deste trabalho foi investigado se os derivados **3g**, **3j** e **3m**, mantinham as propriedades de inibir cisteína protease presente nos extratos proteicos de tripomastigotas, como reportado para o composto *hit* (Monteiro et al., 2019). O efeito dos derivados foi avaliado em uma cinética da atividade enzimática (0 a 1 h a 37°C) na presença do substrato fluorogênico Z-FR-AMC. Todas as amostras analisadas apresentaram atividade de protease, pois foram capazes de hidrolisar o substrato Z-FR-AMC. A incubação dos extratos proteicos de tripomastigotas com os derivados de pirazol promissores (**3g**, **3j** e **3m**) não induziu inibição da atividade enzimática. Os resultados revelaram uma inexpressiva atividade inibitória dos 3 derivados analisados. De maneira geral, a máxima inibição da atividade enzimática, aproximadamente 45%, foi alcançada com 100 µM para os derivados de pirazolimidazolina analisados (Figura 16). A especificidade da atividade de cisteína proteases foi avaliada medindo a hidrólise do substrato Z-FR-AMC na presença do E-64, um inibidor irreversível e seletivo de cisteína protease (Figura 16), que indicou valores significativamente menores (32%) em comparação a atividade controle. E-64, alcançou taxas de inibição maiores que 50% já na concentração de 6,5 µM, sendo cerca de 5 a 50 vezes mais potente que os derivados **3g**, **3j** e **3m** (Figura 16).

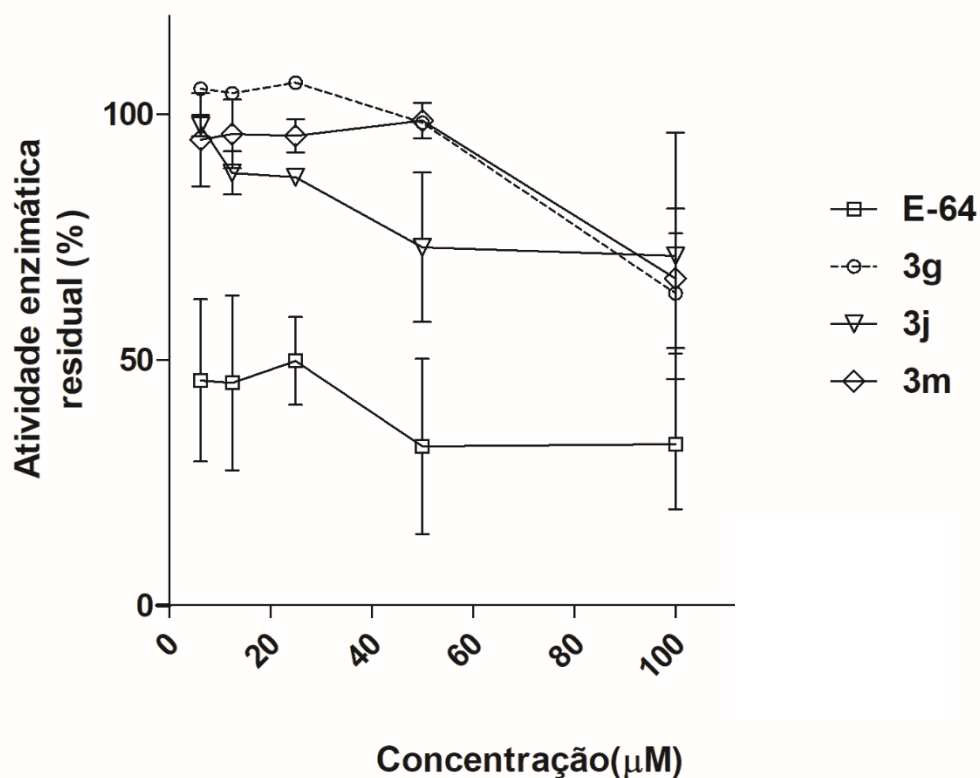


Figura 16. Efeito dos derivados pirazol-imidazolin na atividade de cisteína proteases. Extratos proteicos de tripomastigotas (5μg) foram incubados a 37°C por 1 h com os derivados **3g**, **3j** e **3m** e o inibidor específico E-64. A atividade proteásica foi medida adicionando o substrato Z-FR-AMC (30 μM) em tampão acetato pH 5,0. Diferentes concentrações (100 – 6,25 μM) dos derivados **3g** (Círculo), **3j** (Triângulo), **3m** (Losango) e E-64 (Quadrado) foram incubadas com o extrato e a atividade expressa em atividade enzimática residual (%) em relação ao controle não tratado. Dados representam a média e desvio padrão de pelo menos três ensaios independentes.

6. Discussão

As DTNs afetam principalmente países em desenvolvimento ocasionando alta morbidade e mortalidade, com substancial ônus econômico para os países afetados (Conteh et al., 2010). Embora as DTNs sejam responsáveis por 11% da carga global de doenças, não são prioridade das empresas farmacêuticas e representam uma pequena proporção dos novos medicamentos desenvolvidos a cada ano (Yamey et al., 2018). No período de 2012 a 2018, dos 256 produtos terapêuticos aprovados apenas 3,1% (8 produtos) foram direcionados para DTNs (Ferreira e Andricopulo 2019), apesar dos esforços da OMS e DNDi incentivando programas para descoberta de novos fármacos. Ainda neste contexto, o consórcio *Drug Booster* para DTN, por exemplo, lançado em 2015 com a participação de empresas compartilhando seus conhecimentos e compostos, identificou somente 4 compostos efetivos contra *L. donovani* e *T. cruzi* entre os 18.000 testados, com apenas 1 série progredindo para otimização de composto líder (*Lead compound*) (DNDi 2020). Mais especificamente, para a DC, o principal avanço na última década foi a formulação pediátrica do BZ e sua aprovação pelo FDA, tornando o manejo da doença um grande desafio. Diante deste cenário, este estudo contribui com novas informações sobre a atividade tripanocida de compostos à base de pirazol, uma classe de compostos que se destaca como nova entidade química com potencial antiparasitário.

O planejamento dos compostos, baseado na estrutura do composto *hit* (5-amino-1-*aril*-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazol), e as mudanças estruturais realizadas foram pautadas em dois principais aspectos: (i) a interação do grupo carboxamida com o sítio ativo de cruzipaína, visando melhorar a interação do derivado de pirazol com o alvo molecular (séries 1 e 2), e (ii) a adequação do balanço entre as propriedades físico-químicas (permeabilidade-solubilidade) do composto promovendo sua absorção e associação com domínios hidrofóbicos da molécula alvo. A otimização do composto pirazol-imidazolina com a adição dos substituintes amino e metil teve o intuito de modular a polaridade da molécula. As aminas são altamente reativas devido à sua basicidade e nucleofilicidade e, também podem interferir na solubilidade do composto em água. Ainda, a adição de 3-metil no anel pirazol (série 4) e no anel imidazolina (série 5), aumentando a hidrofobicidade, poderia melhorar a atividade biológica do composto favorecendo a sua interação com domínios hidrofóbicos no sítio de ligação da proteína.

Considerando-se que grande parte das falhas no desenvolvimento de medicamentos podem ser atribuídas à má dissolução em meio aquoso e baixa permeabilidade em membranas celulares, a aplicação das ferramentas *in silico* contribui para a análise de multiparâmetros preditivos de biodisponibilidade oral. Assim, a predição das propriedades físico-químicas de novas entidades químicas tem sido relevante para o desenvolvimento de novos fármacos, uma vez que influenciam em sua farmacocinética e farmacodinâmica (Loftsson 2015). Esta abordagem foi explorada no presente estudos para os derivados de pirazol investigados. Em geral, as mudanças estruturais realizadas (séries 1 a 5) favoreceram o perfil de lipofilicidade dos derivados alcançando, na grande maioria, valores de coeficiente de partição entre 1 e 2,2, considerada a faixa ótima para fármacos (Bennion et al., 2017). Este equilíbrio entre solubilidade em água e lipofilicidade é desejável e pode favorecer a farmacocinética e atividade biológica dos compostos. Os derivados de pirazol planejados são moléculas pequenas (PM<500), facilitando a difusão pela bicamada lipídica. Outras propriedades físico-químicas como grupos de doadores ou aceptores de ligação de hidrogênio, ligações rotacionáveis, TPSA e fração de carbono sp³ também interferem na permeabilidade do composto e, conseqüentemente em sua atividade biológica. Destaca-se que os derivados de pirazol não violam a regra de Lipinski e apresentaram características preditivas de boa permeabilidade, preenchendo os principais critérios de biodisponibilidade oral e *druglikeness*.

Os resultados da análise com os filtros de características estruturais (filtros PAINS) demonstram que os derivados de pirazol não apresentam atividade promíscua, com predição de baixa toxicidade, reatividade ou instabilidade metabólica. PAINS são estruturas químicas que costumam dar resultados falsos positivos em triagem fenotípica de alto rendimento, uma vez que tendem a reagir de forma inespecífica com vários alvos biológicos (Dahlin & Walters 2015). Assim, há uma baixa probabilidade de que a atividade biológica dos derivados de pirazol seja artefato causado pela reatividade promíscua.

As mudanças estruturais modularam diferentemente a atividade biológica dos derivados de pirazol. Como indicado nos resultados deste trabalho, os compostos da das séries 1 e 2 com substituição de imidazolina por carboxamida apresentaram perda da atividade tripanocida. Possivelmente, este fato pode ser explicado devido ao posicionamento da carboxamida na extremidade do composto desfavorecendo seu encaixe no sítio ativo da cruzipaína. No composto 3H5, a carboxamida apresenta um

posicionamento central em sua estrutura química, entre os anéis de pirazol e benzimidazol. Os átomos de nitrogênio e oxigênio da carboxamida deste composto interagem por pontes de hidrogênio com os resíduos aspartato 161 (ASP161), serina 25 (SER25) e glicina 23 (GLY23) localizados em uma fenda no domínio central do sítio ativo da cruzipaina (doi: 10.2210/pdb4W5B/pdb). Portanto, nos derivados das séries 1 e 2, o posicionamento mais externo da carboxamida pode dificultar o acesso do composto ao sítio ativo.

Ainda, a análise da atividade tripanocida dos derivados de pirazol-imidazolina demonstrou efeito distinto entre os estágios de desenvolvimento do parasito. Os derivados de pirazol-imidazolina (séries 3 – 5) revelaram baixa atividade contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, com o análogo **3m** sendo o mais ativo. Em contraste, três compostos, **3g**, **3j** e **3m**, apresentaram boa atividade contra amastigotas intracelulares com potência maior que o BZ e elevado índice de seletividade (IS > 44), sugerindo uma eficácia dependente da inibição de moléculas envolvidas na replicação dos parasitos. Estes dados divergem da atividade do composto *hit* que apresentou atividade 2x maior que o BZ contra tripomastigotas (IC₅₀ = 9,5 ± 1,2 µM) e moderada atividade contra amastigotas intracelulares (IC₅₀ = 16,5 ± 1,6 µM), reforçando que pequenas mudanças estruturais influenciam drasticamente na atividade biológica dos compostos. Destaca-se que a análise de SAR revelou a relevância da inserção de substituintes na posição *para* do anel benzeno, sendo o derivado **3j** (4-Br) mais efetivo, diferindo da posição *meta* identificada previamente no composto *hit* (3,4- e 3,5-diCl) como potencial reguladora da atividade. Apesar do composto **3m** (3-Cl,4-metil) ter similaridades com o composto *hit*, a substituição do átomo de Cl por metil na posição *para*, associada a subtração do grupo amino na série 3 dos derivados de pirazol, aumentou em 3,8x a atividade contra amastigotas intracelulares, provavelmente conferindo ao novo análogo maior permeabilidade por tornar a molécula mais lipofílica, facilitando a interação com o alvo molecular.

Atividade seletiva para amastigotas intracelulares também foi evidenciada em derivados de 3-metil-1-fenil-1H-pirazolo[3,4-b]piridina-4-carbohidrazida com os derivados apresentando baixa ou nenhuma atividade contra tripomastigotas, com perda da atividade tripanocida atribuída a inserção de flúor no C6, capaz de retirar elétron de sistemas contendo anel aromático (Salvador et al., 2015). Ainda, um fenômeno similar foi reportado com posaconazol, um inibidor da biossíntese de ergosterol, que apresenta excelente atividade contra amastigotas intracelulares, na

faixa de nanomolar, mas pouco efetivo contra o estágio não replicativo e amastigotas com baixo ciclo de replicação (amastigotas dormentes), sugerindo que a replicação e a velocidade de seus ciclos podem afetar a eficácia do posaconazol (MacLean et al., 2018). Ensaio de luminescência *in vivo* revelaram que, embora posaconazol seja altamente eficaz na redução da carga parasitária, este fármaco não cura infecções agudas ou crônicas por *T. cruzi* apresentando reativação da infecção após imunossupressão (Francisco et al., 2015).

Por outro lado, híbridos de pirazolo-tiazepina, também identificados como inibidores de CYP51, mostraram boa atividade contra amastigotas intracelulares e tripomastigotas *in vitro*, mas sem eficácia em modelo murino de infecção aguda por *T. cruzi* (cepa Y) (Fiuza et al., 2018). Em contraste, derivados de pirazol N-etilurea, demonstraram potente atividade contra *T. brucei brucei* e *T. cruzi*, com redução drástica da parasitemia após 6 dias de tratamento e eficácia no modelo murino de infecção aguda por *T. cruzi* (cepa Brazil). O estudo de SAR para os derivados de pirazol N-etilurea revelou que a posição *meta* no anel aromático influencia substancialmente a atividade tripanocida, sendo os compostos com os substituintes flúor e cloro os mais efetivos (Varghese et al., 2019).

As lacunas na correlação entre os ensaios *in vitro* e *in vivo* demonstram a necessidade de modelos mais preditivos de eficácia para descoberta de novos fármacos. Assim, a análise de recrudescência do parasitismo *in vitro* foi avaliada no ensaio de reversibilidade com os derivados **3g**, **3j** e **3m**. De forma geral, os compostos foram capazes de controlar o desenvolvimento intracelular reduzindo significativamente a carga parasitária, apesar de não ter eliminação do parasitismo na concentração de IC₉₀. Somente o derivado **3m** (50 µM) foi capaz de inibir a viabilidade do parasito após 3 dias de retirada da pressão do composto, suprimindo a infecção tal como evidenciado para o BZ (100 µM). É possível que a pressão prolongada de tratamento ou mesmo adequação das concentrações que reflitam a janela terapêutica dos compostos promissores possa melhorar a atividade biológica, principalmente do composto **3j** que apresentou melhor potência e IS mais elevado. Além disso, a combinação dos derivados de pirazol promissores (**3g**, **3j** e **3m**) com BZ poderia acarretar um efeito sinérgico e potencializar a atividade tripanocida.

Análogos de nucleosídeo pirrole-[2,3-b]-piridina, que possuem alta atividade tripanocida *in vitro* (submicromolar), foi capaz de suprimir a parasitemia e induzir 100% de sobrevida em modelo murino de infecção aguda por *T. cruzi*, mas houve reativação

da parasitemia após imunossupressão, conforme previsto no ensaio de reversibilidade *in vitro* (Lin et al., 2019). Evidências demonstraram que posaconazol e cinco novos derivados de 3-píridil, identificados como inibidores putativos de CYP51, não são capazes de manter uma atividade tripanocida sustentável *in vitro*, com reativação da infecção após 2 dias sem pressão do composto (Sykes & Avery 2018). Os dados de reversibilidade apoiaram os resultados de ensaio clínico com posaconazol e ravuconazol que suprimiram a parasitemia apenas durante o período de tratamento (60 dias), com reversão da infecção após término do esquema de tratamento e, conseqüentemente, falha terapêutica (Morillo et al., 2017, Torrico et al., 2018). Assim, os resultados de reversibilidade do presente estudo reforçam a tendência de introdução destes ensaios na plataforma de triagem de novos fármacos, permitindo identificar com antecedência a ineficácia de compostos candidatos e evitar sua progressão através do fluxograma da descoberta de novos fármacos.

O desenvolvimento de novos fármacos é um processo lento (em média 15 anos), de alto custo e com baixas taxas de sucesso. Estima-se que menos da metade de todos os medicamentos que ingressam nas fases II e III de ensaios clínicos são aprovados, indicando a necessidade de implementação de novas metodologias mais preditivas na plataforma de triagem de fármacos (Langhans, 2018). A maioria das pesquisas em triagem fenotípica é baseada em experimentos usando culturas de células bidimensionais (2D) *in vitro*. No entanto, as culturas 2D têm muitas limitações, incluindo maior sensibilidade a ação de fármacos, e não representam a complexidade dos tecidos (Jensen & Teng 2020). Portanto, o elevado índice de ineficácia de compostos selecionados na triagem fenotípica em estudos de descoberta de novos fármacos pode estar relacionado com a dificuldade na permeabilidade e absorção dos compostos pelos tecidos. Diferentemente do modelo 2D, onde a interação entre células ocorre apenas lateralmente, o modelo 3D reproduz as interações célula – célula, célula – matriz extracelular, sinalização celular e a fisiologia do microambiente tecidual, mimetizando as condições *in vivo* (Costa et al., 2016). Neste estudo, a aplicação do modelo 3D de células VERO na análise de atividade tripanocida teve a finalidade de avaliar com maior acurácia a eficácia dos compostos promissores **3g**, **3j** e **3m**, uma vez que os esferoides mimetizam a organização dos tecidos, em vários graus, e podem fornecer uma alternativa para redução do uso de modelos animais. Os dados com modelo 3D demonstraram que a infecção dos esferoides de células VERO por *T. cruzi* não foi uniforme, apresentando alta infecção na periferia do

microtecido. No entanto, as camadas celulares internas também foram infectadas, embora em menor proporção, demonstrando a capacidade de migração do parasito para regiões mais profundas do microtecido. De fato, a capacidade de ingressar em camadas celulares mais internas no esferoide parecer envolver uma rota de transmigração paracelular e depende do perfil de virulência das cepas de *T. cruzi*. Cepas virulentas transmigram para domínios mais profundos do microtecido enquanto cepas não-virulentas permanecem nas camadas mais superficiais (Rodríguez et al., 2020). Este evento parece ser determinante na infecção congênita, com recém-nascidos infectados com *T. cruzi* com fenótipo de migração enquanto mães, cujos filhos não foram infectados, apresentam parasitos com perfil de baixa migração (Rodríguez et al., 2020). O tratamento dos esferoides com BZ ou os derivados **3g**, **3j** e **3m** reduziu drasticamente a carga parasitária, sugerindo que as propriedades físico-químicas favoráveis (lipofilicidade/solubilidade) dos derivados permitiu maior permeabilidade nos microtecidos favorecendo a farmacodinâmica e eficácia. Assim, o emprego de modelos mais preditivos da eficácia tripanocida de novos candidatos à fármaco poderá ser benéfico na prevenção de falhas terapêuticas.

O modelo 3D tem sido amplamente utilizado na triagem de compostos para a terapia do câncer, apresentando potencial de aumentar o valor preditivo da pesquisa pré-clínica de medicamentos. A comparação entre os modelos 2D e 3D de linhagens celulares de câncer colorretal e sua resposta à irradiação e quimioterapia com doxorubicina, 5-FU, mitomicina C e cisplatina demonstrou maior resistência do modelo 3D aos tratamentos, refletindo com maior acurácia os tumores em pacientes (Koch et al., 2021). O tratamento de células de carcinoma mamário (células BT549) com 4-(adamantan-1-il)-substituído-(4,5-di-hidro-1*H*-pirazol-1-il) tiazol reduziu o crescimento de esferoides de células BT549 pela inibição do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico, um alvo terapêutico validado, envolvidos na proliferação, diferenciação, invasão, angiogênese, metástase e resistência à apoptose celular (Sebastian et al., 2016). Desta forma, os modelos de cultivo 3D melhoram a previsão pré-clínica de segurança e eficácia do composto candidato e são ensaios *in vitro* mais fidedignos da suscetibilidade humana à resposta ao medicamento.

Modelos *in silico* para prever perfis de moléculas de ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade) foram incorporados ao processo de descoberta de novos fármacos, principalmente em um esforço para evitar falhas de estágio final devido à baixa farmacocinética e toxicidade. A predição

farmacocinética dos candidatos promissores (derivados **3g**, **3j** e **3m**) aponta um excelente perfil de absorção intestinal e hematoencefálica (99% de probabilidade), com predição de biodisponibilidade oral. De forma geral, os derivados **3g**, **3j** e **3m** não são inibidores de CYP450, com exceção de CYP1A2, sugerindo que os compostos passam pela fase I de biotransformação no fígado, podendo gerar metabólitos polares e inativos, facilmente excretados, ou metabólitos com potente atividade biológica e tóxicos. Os derivados não apresentaram perfil mutagênico ou carcinogênico, mas ressalta-se a inibição de hERG, gerando o bloqueio de canais de potássio hERG que pode provocar alteração da atividade elétrica cardíaca e arritmias. Outro importante alerta da análise de ADMET foi a probabilidade de hepatotoxicidade dos derivados de pirazol, que a depender do nível de toxicidade pode acarretar lesões irreversíveis no fígado. Portanto, uma análise mais detalhada da farmacocinética dos derivados de pirazol promissores seria essencial para a determinação de doses e regimes de tratamento dentro da faixa terapêutica.

Considerando que as mudanças estruturais favoreceram a potência dos derivados **3g**, **3j** e **3m** contra amastigotas intracelulares, uma questão relevante foi avaliar se o aumento da atividade estava relacionado à inibição da atividade de cisteína protease, tal como evidenciado no composto *hit* (Monteiro et al., 2019). Os dados de atividade enzimática revelaram que os derivados **3g**, **3j** e **3m** eram fracos inibidores desta enzima, apresentando o valor máximo de 45% de inibição. Portanto, a melhora na atividade tripanocida (~4x) dos derivados candidatos não parece estar associada à inibição da atividade de cisteína protease, que poderia interferir no processo de proliferação e diferenciação das amastigotas intracelulares. Assim, como os derivados **3g**, **3j** e **3m** são ativos apenas contra as formas intracelulares, pode-se especular que estes derivados atuam nos processos intracelulares essenciais para a viabilidade metabólica e multiplicação de amastigotas intracelulares.

Diferentes mecanismos de ação já foram reportados para derivados de pirazol, com a identificação de alvos moleculares essenciais para a subsistência do parasito. A inibição de superóxido dismutase dependente de ferro (Fe-SOD) de tripanossomatídeos, perturbando o sistema de defesa antioxidante dos parasitos, por exemplo, tem destacado a potência dos pirazóis como antiparasitário (Reviriego et al., 2017). Pirazol contendo poliaminas macrocíclicas 1 e 2 mostraram notável atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*, sendo especialmente ativa contra as fases aguda e crônica da infecção experimental por *T. cruzi*, com mecanismo de ação também

envolvendo a inibição de Fe-SOD (Sanchez-Moreno et al., 2012). Derivados de pirazolo, reportados como inibidores da via de biossíntese de ergosterol, apresentaram boa atividade tripanocida contra as formas clínicas relevantes de *T. cruzi* (Fiuza et al., 2018). Portanto, é possível que as mudanças estruturais realizadas no composto *hit* tenham propiciado uma melhor interação dos derivados **3g**, **3j** e **3m** com outro alvo molecular, potencializando a atividade tripanocida destes derivados de pirazol.

Assim, o conjunto de dados gerados neste estudo confirma o potencial tripanocida de derivados de pirazol e incentiva o investimento na identificação do alvo molecular e mecanismo de ação visando o planejamento de novas estruturas potencialmente ativas e seletivas contra *T. cruzi*. Destaca-se ainda, o potencial dos ensaios de reversibilidade (*washout*) e cultivo 3D como estratégia chave na predição de eficácia de novos candidatos à fármacos, contribuindo para a identificação de compostos com potencial de prosseguir em ensaios clínicos para terapia da doença de Chagas.

Conclusões

- ✓ Os derivados de pirazol (séries 1 a 5) não apresentam efeito citotóxico;
- ✓ A substituição do anel imidazolina por carboxamida (séries 1 e 2) no composto *hit* inibiu a atividade tripanocida contra tripomastigotas e amastigotas intracelulares assim como, a introdução de metil nos derivados no anel do pirazol e imidazolina (séries 4 e 5);
- ✓ Os derivados de pirazol-imidazolina, **3g**, **3j** e **3m**, apresentam maior atividade tripanocida contra formas amastigotas de *T. cruzi*;
- ✓ Os dados da relação estrutura-atividade demonstram que a presença de substituintes como bromo, cloro e metil na posição *para* do anel benzênico potencializa a atividade dos derivados pirazol-imidazolina (1-*aril*-4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)-1*H*-pirazol);
- ✓ O derivado **3m** foi o único, entre os derivados de pirazol promissores, capaz de inibir a viabilidade do parasito e prevenir a recrudescência do parasitismo após a remoção do composto;
- ✓ Os compostos promissores (**3g**, **3j** e **3m**) apresentam predição de biodisponibilidade oral com elevada absorção intestinal, mas possuem risco de hepatotoxicidade e inibição de hERG;
- ✓ O composto **3m** apresentou atividade tripanocida para formas amastigotas compatível com o BZ no modelo 3D (esferoide), indicativo de boa permeabilidade, absorção e eficácia no microtecido;
- ✓ As mudanças estruturais realizadas nos derivados pirazol-imidazolina (**3g**, **3j** e **3m**) potencializaram a atividade contra amastigotas intracelulares, mas prejudicou a atividade inibitória de cisteína protease comparada ao composto *hit*, sugerindo o envolvimento de outros mecanismos de ação.

7. Referências

- Ackermann AA, Panuzi LG, Cosentino RO, Sánchez DO, Agüero F. 2012. A genomic scale map of genetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. BMC Genomics . 27;13:736.
- Alam J, Alam O, Alam P, Naim MJ 2015. A Review on Pyrazole chemical entity and Biological Activity. International Journal of Pharma Sciences and Research 6: 1433.
- Aldasoro E, Posada E, Reguena-Méndez A, Calvo-Cano A, Serret N, Casellas A, Sanz S, Soy D, Pinazo MJ, Gascon J. 2017. What to expect and when: benznidazole toxicity in chronic Chagas' disease treatment. J Antimicrob Chemother. 1;73(4):1060-1067
- Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF, Bourguignon SC, Souza W, Azambuja P, Gonzalez MS. 2007. Trypanosoma cruzi: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of Rhodnius prolixus. Exp Parasitol. 116(1):44-52.
- Anam Ansari, Abad Ali, Mohd Asif and Shamsuzzaman 2017. Review: biologically active pyrazole derivatives. New Journal of Chemistry 10.1039.
- Andrade JP, Marin-Neto JA, Paola AAV, Vilas-Boas F, Oliveira GMM, Bacal F, Bocchi EA, Almeida DR, Fragata-Filho AA, Moreira MCV, Xavier SS, Oliveira-Junior WA, Dias JCP. 2011. I Latin American Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas' heart disease: executive summary. Arq Bras Cardiol. 96(6):434-42
- Andrews RK, Booth WJ, Bendall LJ, Berndt MC. 1995. The amino Acid sequence glutamine-628 to valine-646 within the A1 repeat domain mediates binding of von Willebrand factor to bovine brain sulfatides and equine tendon collagen. Platelets. 6(5):245-51.
- Antinori S, Galimberti L, Bianco R, Grande R, Galli M, Corbellino M. 2017. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. Eur J Intern Med. 43:6-15.
- Araujo PF, Almeida AB, Pimentel CF, Silva AR, Souza A, Valente AS, Valente VC, Britto MM, Rosa Ac, Alves RM, Hagstrom, Teixeira ARI. 2017. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. Mem Inst Oswaldo Cruz. 112(6):437-446.
- Beaulieu C, Isabel E, Fortier A, Massé F, Mellon C, Méthot N, Ndao M, Nicoll-Griffith D, Lee D, Park H, Black WC. 2010. Identification of potent and reversible cruzipain inhibitors for the treatment of Chagas disease. Bioorg Med Chem Lett. 15;20(24):7444.
- Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Real JP, Palma S. 2016. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta Trop. 156:1-16.
- Bern C. Chagas disease in the immunosuppressed host. 2012. Curr Opin Infect Dis. 25(4):450-7.

- Bhat M, Belagali SL. 2018. Synthesis, characterization and biological screening of pyrazole-conjugated benzothiazole analogs. *Future Med Chem.* 10(1):71-87.
- Bocchi EA 2013. Heart Failure in South America. *Curr Cardiol Rev.* 9(2):147-56.
- Bourguignon SC, de Souza W, Azambuja P, Gonzalez MS 2007. *Trypanosoma cruzi*: attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. *Experimental Parasitology* 116: 44–52.
- Branquinha MH, Oliveira SSC, Sangenito LS, Sodre CL, Kneipp LF, d'Avila-Levy CM, Santos ALS. 2015. Cruzipain: An Update on its Potential as Chemotherapy Target against the Human Pathogen *Trypanosoma cruzi*. *Curr Med Chem.* 22(18):2225-35.
- Brasil. Ministério da Saúde. Portaria Portaria nº 264, de 17 de Fevereiro de 2020.
- Brasil. Ministério da Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de Chagas aguda transmitida por alimentos. 2006.
- Brenner Z. 1961. The therapeutic activity of furaltadone, furazolidone and furadantine in experimental infection of the mouse by "*Trypanosoma cruzi*". *Hospital (Rio J).* 60:947-51.
- Cardoso GM, Morato MJ, Gomes JAS, Bonfim IP, Williams-Blangero S, VandeBerg JL, Reis MR, Magalhães EFL, Correa-Oliveira R. 2006. Comparative analysis of cell phenotypes in different severe clinical forms of Chagas' disease. 1;11:1158-63.
- Carlier Y. 2011. Globalization of Chagas disease (American trypanosomiasis): the situation in Europe and Belgium. *Bull Mem Acad R Med Belg.* 166(10-12):347-55.
- Cavalier-Smith T 2010. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett* 6(3):342–5.
- Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. 2001. The major cysteine proteinase of *Trypanosoma cruzi*: a valid target for chemotherapy of Chagas disease. *Curr Pharm Des.* 7(12):1143-56.
- Cazzulo JJ, Labriola C, Parussini F, Duschak VG, Martinez J, Franke de Cazzulo BM. 1995. Cysteine proteinases in *Trypanosoma cruzi* and other Trypanosomatid parasites. *Acta Chim Slov;* 42: 409-18.
- Chao C, Leone JS, Vigliano CA. 2020. Chagas disease: Historic perspective. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 1;1866(5):165689.
- Conteh L, Engels T, Molyneux DH. 2010. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. *Lancet.* 16;375(9710):239-47.
- Costa EC, Moreira AF, de Melo-Diogo D, Gaspar VM, Carvalho MP, Correia IJ. 2016. 3D tumor spheroids: an overview on the tools and techniques used for their analysis. *Biotechnol. Adv.* 1427–1441.
- Coura JR, De Castro SL 2002. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97(1):3–24.

Dahlin JL, Walters MA. 2016. How to Triage PAINS-Full Research. *Assay Drug Dev Technol.*14(3):168-74.

De Souza W, De Carvalho TMU, Barrias ES 2010. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *Int J Cell Biol* 2010. pii: 295394.

Dias JCP, Ramos-Jr NA, Gontijo ED, Luquetti A, Shakinai-Yasuda MA, Coura JR, Torres RM, Melo JRC, Almeida EA, Oliveira-Jr W, Silveira AC, Rezende JM, Pinto FS, Ferreira AW, Rassi A, Fragata-Filho A, Souza AS, Correia-Filho D, Jansen AM, Andrade GMQ, Britto CFPC, Neves-Pinto AY, Rassi Jr A, Campos DE, Abad-Franch F, Santos SE, Chiari E, Hasslocher-Moreno AM, Moreira EF, Marqjues DSO, Silva EL, Marin-Neto JA, Galvão LMC, Xavier SS, Valente SAS, Carvalho NB, Cardoso AV, Vivaldini SM, Oliveira SM, Valente VC, Lima MM, Alves RV. 2016. [Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015]. *Epidemiol Serv Saude.* 25(spe):7-86.

Dias JCP, Ramos Júnior NA, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. 2015. II Consenso brasileiro em doença de chagas, *Epidemiol Serv Saude.* 25(nº esp):7-86.

Dias JCP, Amato Neto V, Luna EJ de A 2011. Artigo de Opinião / Opinion Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev da Soc Bras Med Trop* 44(3)375-379.

Dias JCP, Machado EMM, Borges EC, Moreira EF, Gontijo C, Azeredo BVM. 2002. Chagas' disease in Lassance, Minas Gerais State: Clinical-epidemiological re-evaluation ninety years after the discovery by Carlos Chagas, *Med Trop* 35(2):167-76.

Dias JC, Schofield CJ. 1998. The of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative. *Rev Soc Bras Med Trop.* 31(4):373-83.

Docampo R, Moreno SN. 1986. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Fed Proc.* 45(10):2471-6.

Doyle PS, Zhou YM, Hsieh I, Greenbaum DC, McKerrow JH, Engel JC. 2011. The *Trypanosoma cruzi* protease cruzain mediates immune evasion. *PLoS Pathog.* 7(9):e1002139.

Drug for Neglected diseases initiative (DNDi) 2018. Pediatric benznidazole. <https://www.dndi.org/achievements/paediatric-benznidazole/>

Drug for Neglected diseases initiative (DNDi) 2018. Clinical trials. <https://www.dndi.org/2016/clinical-trials/clinical-trials-chagas/>

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) 2020. 8 new treatments made available recommended and implemented. <https://www.dndi.org/research-development/treatments-delivered/>

Drugs for Neglected Diseases initiative (DNDi) 2021. Current treatments. <https://www.dndi.org/doencas/doenca-chagas/tratamentos-atuais/>

Duschak VG. 2011. A decade of targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 1;6(3):216-59.

Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH. 1998. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*. 17;188(4):725-34.

Faria JV, Vegi PF, Miguita AGC, Dos Santos MS, Boechat N, Bernardino AMR 2017. Recently reported biological activities of pyrazole compounds. *Bioorg Med Chem*. 25(21):5891-5903.

Ferreira LLG, Andricopulo AD. 2019. ADMET modeling approaches in drug discovery. *Drug Discov Today*. 24(5):1157-1165.

Ferreira HO, Prata A, Rassi A. 1963. [Prolonged administration of nitrofurazone in the treatment of acute Chagas' disease]. *Hospital (Rio J)*. 63:1391-6.

Filigheddu MT, Górgolas M, Ramos JM. 2017. Orally-transmitted Chagas disease. *9;148(3):125-131*.

Fiuza L, Peres RB, Simões-Silva MR, da Silva PB, Batista DDGJ, da Silva CF, Nefertiti Silva da Gama A, Krishna Reddy TR, Soeiro MNC 2018. Identification of Pyrazolo[3,4-e][1,4]thiazepin based CYP51 inhibitors as potential Chagas disease therapeutic alternative: In vitro and in vivo evaluation, binding mode prediction and SAR exploration. *Eur J Med Chem*. 149:257-268.

Flores-Chavez MD, Merino FJ, Garcia-Bujalance, Martin-Rabadan P, Merino P, Garcia-Bermejo I, Delgado A, Cuadros J, Working Group on Chagas 2011. Diseases of Autonomous Community of Madrid. Surveillance of Chagas disease in pregnant women in Madrid, Spain, from 2008 to 2010. *Euro Surveill*. 22;16(38):19974.

Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, Taylor MC, Chatelain E, Kelly JM. 2015. Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging. *Antimicrob Agents Chemother*. 59(8):4653-61.

Galvão, C., org. Vetores da doença de chagas no Brasil [online]. Curitiba: Sociedade Brasileira de Zoologia, 2014, 289 p. Zoologia: guias e manuais de identificação series. ISBN 978-85-98203-09-6. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

Garzoni, L.R., Adesse, D., Soares, M.J.; Rossi, M.I.D.; Borojevic, R.; Meirelles, M.N.L. 2008 Fibrosis and hypertrophy induced by *Trypanosoma cruzi* in a three-dimensional cardiomyocyte-culture system. *J. Infect. Dis*, 197, 906–915.

Gómez JIP, Peremiquel-Trilhas P, Guiu IS, Choque E, Souto IO, Delcor NS, Sulleiro E, Espasa M, Pastoret C, Los Santos JJ, Ouaraab H, Viñas PA, Terren CA. 2019. A Community-Based Intervention for the Detection of Chagas Disease in Barcelona, Spain. *J Community Health*. 44(4):704-711.

Goldenberg S, Ávila AR. 2020. Aspects of *Trypanosoma cruzi* Stage Differentiation. *Advances in Parasitology*, Volume 75. ISSN 0065-308X.

Guarner J. 2019. Chagas disease as example of a reemerging parasite. *Semin Diagn Pathol*; 36(3):164-169.

Henriques, C., Castro, D.P., Gomes, L.H.F., Garcia, E.S., de Souza, W. 2012 Bioluminescent imaging of *Trypanosoma cruzi* infection in *Rhodnius prolixus*. *Parasites Vectors*, 5, 214–229.

Hofflin JM, Sadler RH, Araujo FG, Page WE, Remington JS. 1987. Laboratory-acquired Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 81(3):437-40.

Hotez P, Aksoy S. 2017. PLOS Neglected Tropical Diseases: Ten Years of progress in neglected tropical disease control and elimination... Mor or less. *Plos Negl Trop Dis.* 20;11(4):e0005355.

Jensen C, Teng Y. 2020. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci.* 6;7:33.

Kapalczyńska M, Kolenda T, Przybyła W, Zajączkowska M, Teresiak A, Filas V, Ibbs M, Bliźniak R, Luczewski L, Lamperska K. 2018. 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Archives of medical science : AMS*, 14(4), 910–919.

Karrouchi K, Radi S, Ramli Y, et al.,. 2018. Synthesis and Pharmacological Activities of Pyrazole Derivatives: A Review. *Molecules.* 23(1). pii: E134.

Koch J, Monch D, Maa A, Gromoll C, Hehr T, Leibold T, Schlitt HJ, Dahlke M, Renner P. 2021. Three dimensional cultivation increases chemo- and radioresistance of colorectal cancer cell lines. *PLoS One* 4;16(1):e0244513..

Kratz JM, Bournissen FG, Forsyth CJ, Sosa-Estani S. 2018. Clinical and pharmacological profile of benznidazole for treatment of Chagas disease. 11(10):943-957.

Kumar G, Tanwar O, Kumar J, Akhter M, Sharma S, Pillai CR, Alam MdM, Zama MS. 2018. Pyrazole-pyrazoline as promising novel antimalarial agents: A mechanistic study. *Eur J Med Chem.* 10;149:139-147.

Langhans SA. 2018. Three-Dimensional *in Vitro* Cell Culture Models in Drug Discovery and Drug Repositioning. *Front Pharmacol.* 9:6.

Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. 2013. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. *Lancet Infect Dis.* 13:342–8. doi: 10.1016/S1473-3099(13)70002-1.

Ley, V., Andrews, N. W., Robbins, E. S. and Nussenzweig, V. 1998. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *The Journal of Experimental Medicine* 168, 649–659.

Lidani KCF, Andrade FA, Bavia L, Damasceno FS, Beltrame MH, Messias-Reason IJ, Sandri TL. 2019. Chagas Disease: From Discovery to a Worldwide Health Problem. *Front Public Health.* 2;7:166.

Lin C, Hulpia F, Silva CF, Batista DGJ, Hecke KV, Maes L, Caljon G, Soeiro MNC, Calenbergh SV. 2019. Discovery of Pyrrolo[2,3- *b*]pyridine (1,7-Dideazapurine)

Nucleoside Analogues as Anti- *Trypanosoma cruzi* Agents. J Med Chem. 10;62(19):8847-8865.

Liu H, Ren ZL, Wang W, Gong JX, Chu MJ, Ma QW, Wang JC, Lv XH 2018. Novel coumarin-pyrazole carboxamide derivatives as potential topoisomerase II inhibitors: Design, synthesis and antibacterial activity. Eur J Med Chem. 157:81-87.

Loftsson T. 2015. Excipient pharmacokinetics and profiling. Int J Pharm. 1;480(1-2):48-54.

London Declaration on Neglected Tropical Diseases. Uniting to Combat NTDs. http://unitingtocombatntds.org/sites/default/files/document/london_declaration_on_ntds.pdf (acessado em 06/06/2021).

MacLean LM, Thomas J, Lewis MD, Cotillo I, Gray DW, Rycker M. 2018. Development of *Trypanosoma cruzi* in vitro assays to identify compounds suitable for progression in Chagas' disease drug Discovery. PLoS Negl Trop Dis. 12;12(7):e0006612.

Marcili A, Lima L, Cavazzana M, Junqueira ACV, Veludo HH, Silva FM, Campaner M, Paiva F, Nunes VLB, Teixeira MMG. 2009. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. 136(6):641-55.

Martins-Melo FR, Ramos-Jr, NA, Alencar CH, Heukelbach J. 2016. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000-2011. Bull World Health Organ 1;94(2):103-10.

Marin-Neto JÁ, de Almeida OC, Pazin-Filho A, Maciel BC. 2002. Indeterminate form of Chagas' disease. Proposal of new diagnostic criteria and perspectives for early treatment of cardiomyopathy. Arq Bras Cardiol. 79(6):623-7.

McKerrow JH. 2018. Update on drug development targeting parasite cysteine proteases. PLoS Negl Trop Dis. 23;12(8):e0005850.

McKerrow JH, Doyle OS, Engel JC, Podust LM, Robertson AS, Ferreira R, Saxton T, Arkin N, Kerr ID, Brinen LS, Craik. 2009. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104 Suppl 1(01):263-9.

Meta E, Brullo C, Tonelli M, Franzblau SG, Wang Y, Ma R, Baojie W, Orena BS, Pasca MR, Bruno O. 2019. Pyrazole and imidazo[1,2-b]pyrazole Derivatives as New Potential Antituberculosis Agents. Med Chem. 15(1):17-27.

Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A 2014. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic. Chagas' disease. N Engl J Med 370(20):1899-908.

Monteiro ME, Lechuga G, Lara LS, Souto BA, vigaró MG, Bourguignon SC, Calvet CM, Oliveira Jr FOR, Alves CR, Souza-Silva F, Santos MS, Pereira MCS. 2019. Synthesis, structure-activity relationship and trypanocidal activity of pyrazole-imidazoline and new pyrazole-tetrahydropyrimidine hybrids as promising chemotherapeutic agents for Chagas disease. *Eur J Med Chem.* 15;182:111610.

Moretti NS, Mortara RA, Schekman S. 2019. *Trypanosoma cruzi*. *Trends Parasitol.* 36(4):404-405.

Morillo CA, Waskin H, Sosa-Etani S, Bangher MDC, Cuneo C, Milesi R, Mallagray M, Apt W, Beloscar J, Gascon J, Molina I, Echeverria LE, Colombo H, Pérez-Molina JA, Wyss F, Meeks B, Bonilla LR, Gao P, Wei B, McCarthy M, Yusuf S, STOP-CHAGAS Investigators.

Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A Jr, Rosas F, Villena E, Quiroz R, Bonilla R, Britto C, Guhl F, Velazquez E, Bonilla L, Meeks B, Rao-Melacini P, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, Connolly SJ, Yusuf S; BENEFIT Investigators. 2015. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic. Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med* 373(14):1295–306.

Naim MJ, Alam O, Nawaz F, Alam MJ, Alam P. 2016. Current status of pyrazole and its biological activities. *J Pharm Bioallied Sci.* 8(1):2-17.

Ndao M, Beaulieu C, Black WC, Isabel E, Vasquez-Camargo F, Nath-Chowdhury M, Massé F, Mellon C, Methot N, Nicoll-Griffith DA. 2014. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a Chagas disease cure. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(2):1167-78.

Neeki MM, Park M, Sandhu K, Seiler K, Toy J, Rabiei M, Adigoupula S. 2017. Chagas Disease-induced Sudden Cardiac Arrest. *Clin Pract Cases Emerg Med.* 9;1(4):354-358.

Nielebock MAP, Moreira OC, Xavier SMC, Miranda LFC, de Lima ACB, Pereira TOJS, Hasslocher-Moreno AM, Britto C, Sengenis LHC, Saraiva RM. 2020. Association between *Trypanosoma cruzi* DTU TcII and chronic Chagas disease clinical presentation and outcome in an urban cohort in Brazil. *Plos One.* 2;15(12):e0243008

Nunes MCP, Beaton A, Acquatella H, Bern C, Bolger AF, Echeverría LE, Dutra WO, Gascon J, Norillo CA, Oliveira-Filho J, Ribeiro ALP, Martin-Neto JA. 2018. Chagas Cardiomyopathy: An Update of Current Clinical Knowledge and Management: A Scientific Statement From the American Heart Association. 18;138(12):e169-e209.

Oliveira RAS, Azevedo-Ximenes E, Luzzati R, Garcia RC 2010. The hydroxynaphthoquinone lapachol arrests mycobacterial growth and immunomodulates host macrophages. *Int Immunopharmacol* 10(11):1463–73.

Palos I, Lara-Ramirez EE, Lopez-Cedillo JC, Garcia-Perez C, Kashif M, Bocanegra-Garcia V, Nogueira-Torres B, Rivera G. 2017. Repositioning FDA Drugs as Potential Cruzain Inhibitors from *Trypanosoma cruzi*: Virtual Screening, In Vitro and In Vivo Studies. *Molecules.* 18;22(6):1015.

- Pérez-Molina JA, Molina I. 2018. Chagas disease. *Lancet*. 6;391(10115):82-94.
- Petravicius PO, Costa-Martins AG, Silva MN, Reis-Cunha JL, Bartholomeu DC, Teixeira MMG, Zingales B. 2019. Mapping benznidazole resistance in trypanosomatids and exploring evolutionary histories of nitroreductases and ABCG transporter protein sequences. *Acta Trop*. 200:105161.
- Pinheiro LCS, Feitosa LM, Gandi MO, Silveira FF, Boechat N. 2019. The Development of Novel Compounds Against Malaria: Quinolines, Triazolpyridines, Pyrazolopyridines and Pyrazolopyrimidines. *Molecules*. 13;24(22):4095.
- Rassi A, Rassi A, Marin-Neto JÁ 2010. Chagas disease. *The Lancet* 375(9723):1388-402.
- Rassi Jr A, Rassi A, de Rezede JM. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 26(2):275-91.
- Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, Cucunubá ZM. 2014. First report of human *Trypanosoma cruzi* infection attributed to TcBat genotype. *Zoonoses Public Health*. 61(7):477-9.
- Reviriego F, Olmo F, Navarro P, Marín C, Ramírez-Macías I, García-España E, Albelda MT, Guitiérrez-Sánchez R, Sánchez-Moreno M, Arán VJ. 2017. Simple dialkyl pyrazole-3,5-dicarboxylates show in vitro and in vivo activity against disease-causing trypanosomatids. *Parasitology*. 144(9):1133-1143.
- Ribeiro V, Dias N, Paiva T, Hagstrom-Bex L, Nitz N, Pratesi R, Hecht M. 2020. Current trends in the pharmacological management of Chagas disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 12:7-17.
- Ribeiro M, Nitz N, Santana C, Moraes A, Hagstrom L, Andrade R, Rios A, Souza A, Dallago B, Gurgel-Gonçalves R, Hecht M. 2016. Sexual transmission of *Trypanosoma cruzi* in murine model. *Exp Parasitol*. 162:1-6.
- Rodríguez, ME, Rizzi, M, Caeiro LD, Masip YE, Perrone A, Sánchez DO, Búa J, Tekiel V. 2020. Transmigration of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes through 3D cultures resembling a physiological environment. *Cellular microbiology*. 22(8), e13207.
- Salvador RRS, Bello ML, Barreto IRL, Vera MAF, Muri EMF, Albuquerque SDE, Dias LRS. 2016. New carbohydrazide derivatives of 1H-pyrazolo[3,4-b]pyridine and trypanocidal activity. *An Acad Bras Cienc*. 88(4):2341-2348.
- Sánchez-Moreno M, Sanz AM, Gómez-Contreras FG, Navarro P, Marín C, Ramírez-Marcias I, Rosales MJ, Olmo F, Garcia-Aranda I, Campavo L, Cano C, Arrebola F, Yunta MJR. 2011. In vivo trypanosomicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against acute and chronic phases of Chagas disease. *J Med Chem*. 24;54(4):970-9.
- Sánchez-Valdéz FJ, Padilla A, Wang W, Orr D, Tarleton RL. 2018. Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. *Elife*. 26;7:e34039.

Santana RAG, Guerra MGVB, Souza DR, Couceiro K, Ortiz JV, Oliveira M, Ferreira LS, Souza KR, Tavares IC, Morais RF, Silva GAV, Melo GC, Vergel GM, Albuquerque BC, Arcanjo ARL, Monteiro WM, Ferreira JMBB, Lacerda MVG, Silveira H, Guerra JAO. 2019. Oral Transmission of *Trypanosoma cruzi*, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 25(1):132-135.

Santos CD, Caldeira JC, Toldo MPA, Prado JC. 2005. *Trypanosoma cruzi*: effects of repetitive stress during the development of experimental infection. *Exp Parasitol.* 110(2):96-101.

Sebastian A, Pandey V, Mohan CD, Chia YT, Rangappa S, Mathai , Baburajeev CP, Paricharak S, Mervin LH, Bulusu KC, Fuch JE, Bender A, Yamada S, Bassapa, Lobie PE, Rangappa KS. 2016. Novel Adamantanyl-Based Thiadiazolyl Pyrazoles Targeting EGFR in Triple-Negative Breast Cancer. *ACS Omega.* 31;1(6):1412-1424.

Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, Juliano L, Muller-Esterl W. 2000. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med.* 6;192(9):1289-300.

Sharshira EM, Hamada NMM. 2011. Synthesis and in vitro antimicrobial activity of some pyrazolyl-1-carboxamide derivatives. *Molecules.* 9;16(9):7736-45.

Silveira AC, da Silva GR, Prata A. 2011. Seroprevalence survey of human Chagas' infection (1975-1980). *Rev Soc Bras Med Trop.* 2:33-9.

Silveira AC, Feitosa VR, Borges R. 1984. Distribution of Triatominae captured in a domestic environment, 1975/83, Brazil. *Rev Bras Malariol Doencas Trop.* 36:15-312.

Sykes ML, Avery VM. 2018. 3-pyridyl inhibitors with novel activity against *Trypanosoma cruzi* reveal in vitro profiles can aid prediction of putative cytochrome P450 inhibition. *Sci Rep.* 20;8(1):4901.

Soares MJ. 1999. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1:139-41.

Souto-Padrón T, Campetella OE, Cazzulo JJ, de Souza W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J Cell Sci.* 96 (Pt 3):485-90.

Tibayrenc M. 1998. Beyond strain typing and molecular epidemiology: integrated genetic epidemiology of infectious diseases. *Parasitol Today.* 14(8):323-9.

Torrice F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-Veja C, Pinazo MJ, Schijman A, Almeida AC, Alves F, Strub-Wourgaft N, Ribeiro I, E1224 Study Group. 2018. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis.* 18(4):419-430.

Tomasini N. 2018. Introgression of the Kinetoplast DNA: An Unusual Evolutionary Journey in *Trypanosoma cruzi*. *Curr Genomics.* 19(2):133-139.

Tyler KM, Engman DM 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 31(5–6):472–81.

Vaidya AB, Morrisey JM, Zhang Z, Das S, Daly TM, Otto TD, Spillman NJ, Wyvratt M, Siegl P, Marfurt J, Wirijanata G, Sebayang BF, Price RN, Chatterjee A, Nagle A, Stasiak M, Charman AS, Ângulo-Barturen I, Ferrer S, Jiménez-Díaz MB, Martínez MS, Gamo FJ, Avery VM, Ruecker A, Delves M, Kirk K, Berriman M, Kortagere S, Burrows J, Fan E, Bergman LW. 2014. Pyrazoleamide compounds are potent antimalarials that target Na⁺ homeostasis in intraerythrocytic Plasmodium falciparum. Nat Commun. 25;5:5521.

Vannier-Santos MA, Brunoro GV, Soeiro MNC, DeCastro SL, Menna-Barreto RFS. 2019. Parasite, Compartments, and Molecules: Trick versus Treatment on Chagas Disease. 10.57772.

Varghese S, Rahmani R, Russel S, Deora GS, Ferrins L, Toynton A, Jones A, Sykes M, Kessler A, Eufrásio A, Corfeiro AT, Sherman J, Rodriguez A, Avery VM, Piggot MJ, Baell JB. 2019. Discovery of Potent *N*-Ethylurea Pyrazole Derivatives as Dual Inhibitors of *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. ACS Med Chem Lett. 9;11(3):278-285

Verma R, Verma SK, Rakesh KP, Girish YR, Ashrafizadeh M, Kumar KSS, Rangappa KS. 2021. Pyrazole-based analogs as potential antibacterial agents against methicillin-resistance staphylococcus aureus (MRSA) and its SAR elucidation. Eur J Med Chem. 15;212:113134. rma R, Verma SK, Rakesh KP, Girish YR, Ashrafizadeh M, Kumar KSS, Rangappa KS. 2019. Pyrazole-based analogs as potential antibacterial agents against methicillin-resistance staphylococcus aureus (MRSA) and its SAR elucidation. Eur J Med Chem. 15;212:113134.

Vizzoni AG, Varrela MC, Sangenis LHC, Hasslocher-Moreno AM, Americano do Brasil PEA, Saraiva RM. 2018. Ageing with Chagas disease: an overview of an urban Brazilian cohort in Rio de Janeiro. Parasit Vectors. 19;11(1):354.

World Health Organization 2015. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases. Available from: http://www.who.int/neglected_diseases

World Health Organization 2020. Available from: <https://www.who.int/chagas/epidemiology/en/>

World Health Organization 2021. What is the impact of Chagas disease? Available from: <https://dndi.org/diseases/chagas/facts/>

Yamey G, Batson A, Kilmarx PH, Yotebieng M. 2018. Funding innovation in neglected diseases. BMJ. 20;360:k1182.

Zingales B. 2018. Trypanosoma cruzi genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Trop. 184:38-52.

Zingales B, Miles MA, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, Ribeiro I; 2014. Drugs for Neglected Disease Initiative. Chagas Clinical Research Platform Meeting Drug discovery for chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. Mem Inst Oswaldo Cruz 109(6):828–33.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 12(2):240–53.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 104(7):1051-4.

Zumaya-Estrada FA, Messenger LA, Lopez-Ordonez T, Lewis MD, Flores-Loez CA, Martínez-Ibarra AJ, Pennington PM, Cordon-Rosales C, Carrasco HV, Segovia M, Miles MA, Llewellyn MS. North American import? Charting the origins of an enigmatic *Trypanosoma cruzi* domestic genotype. Parasitic Vectors. 10;5:226.