

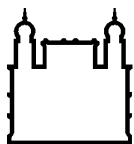
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

REPOSICIONAMENTO E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS PARA
TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS E O POTENCIAL IMPACTO DE
COINFECÇÃO HELMÍNTICA NA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA*
CRUZI

MARIANNE ROCHA SIMÕES SILVA

Rio de Janeiro
20 de dezembro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

MARIANNE ROCHA SIMÕES SILVA

Reposicionamento e combinação de fármacos para terapia da doença de Chagas e o potencial impacto de coinfeção helmíntica na infecção por *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro

RIO DE JANEIRO
20 de dezembro de 2018

Rocha Simões Silva, Marianne.

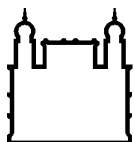
Reposicionamento e combinação de fármacos para terapia da doença de Chagas e o potencial impacto de coinfeção helmíntica na infecção por *Trypanosoma cruzi* / Marianne Rocha Simões Silva. - Rio de Janeiro, 2018.
201 f.; il.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2018.

Orientadora: Maria de Nazaré Correia Soeiro.

Bibliografia: f. 173-195

1. Doença de Chagas. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. reposicionamento de fármacos. 4. combinação de compostos. 5. coinfeção helmíntica. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTORA: MARIANNE ROCHA SIMÕES SILVA

REPOSICIONAMENTO E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS PARA TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS E O POTENCIAL IMPACTO DE COINFEÇÃO HELMÍNTICA NA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

ORIENTADORA: Prof. Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro

Aprovada em: 20 / 12 / 2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (IOC/Fiocruz) - *Presidente*

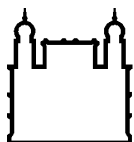
Prof. Dr. Israel Felzenszwalb (Universidade Estadual do Rio de Janeiro)

Prof^a. Dr^a. Técia Maria Ulisses de Carvalho (Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Figueiredo (Farmanguinhos/Fiocruz)

Prof. Dr. Francisco Odencio Rodrigues de Oliveira Junior (IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ata da defesa de tese de doutorado em Biologia Parasitária de **Marianne Rocha Simões Silva**, sob orientação da Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro. Ao vigésimo dia do mês de dezembro de dois mil e dezoito, realizou-se às dez horas, no Auditório Emmanuel Dias/FIOCRUZ, o exame da tese de doutorado intitulada: **"REPOSICIONAMENTO E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS PARA TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS E O POTENCIAL IMPACTO DE COINFEÇÃO HELMÍNTICA NA INFECÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*"** No programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Desenvolvimento de Métodos de Diagnóstico e Controle das Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Israel Felzenszwalb - UERJ/RJ, Dr^a. Tecia Maria Ulisses de Carvalho - UFRJ/RJ e como suplentes: Dr^a. Maria Raquel Figueiredo - FARMANGUINHOS/FIOCRUZ e Dr. Francisco Odencio Rodrigues de Oliveira Junior - 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 tese de doutorado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Doutora em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2018.

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Presidente da Banca):

Dr. Israel Felzenszwalb (Membro da Banca):

Dr^a. Tecia Maria Ulisses de Carvalho (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador 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/iocensino

Dedico aos queridos familiares e amigos
que participaram da minha árdua e
prazerosa jornada acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por cada dia que me levantei com saúde e disposição para realizar meu trabalho com toda a determinação, sempre muito orgulhosa de fazer parte da história da Fundação Oswaldo Cruz. Agradeço pela luz no meu caminho que guia os meus passos pela estrada acadêmica e me direciona às novas portas que preciso abrir.

Obrigada aos meus pais, Elisabete e Mauro, que me ensinaram a ter ética e dedicação no trabalho, e fomentaram minha educação e meu apetite insaciável pelo conhecimento. Obrigada à minha irmã, Júlia, minha grande companheira, o abraço mais aconchegante para todo e qualquer momento. Obrigada ao meu namorado, Stefan, pela atenção e o carinho sem limites, e por me ensinar a ser paciente.

Agradeço à Dr^a Nazaré Soeiro por depositar em mim sua confiança, sendo base firme para apoiar meus pés durante minha árdua caminhada. Obrigada à toda equipe do Laboratório de Biologia Celular pela convivência, sempre prontos a ajudar em meio a suas próprias dificuldades. Especialmente agradeço a Aline Nefertiti, Camila Cardoso, Dr Carlos Fernando Araújo, Dr^a Cristiane França, Dr^a Denise Gama, Diego Campos, Dr Gabriel Oliveira, Kelly Demarque, Ivana Melo, Karine Lima, Ludmila Fiuza, Luiza Pereira, Juliana Magalhães, Julianna Siciliano, Marcos Baldez, Marcos Meuser, Patrícia Bernardino e Raíza Brandão, que participaram intensamente do meu doutorado.

A convivência com os laboratórios vizinhos foi também importante. Um café, um papo no corredor, um breve 'bom dia', o uso de um equipamento, um reagente emprestado... Agradeço, portanto, ao Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos e ao Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas. Agradeço inclusive a calorosa e prestativa equipe de limpeza e portaria do pavilhão Cardoso Fontes.

O meu 'muito obrigado' aos diligentes colaboradores do Instituto Oswaldo Cruz: Dr^a Cynthia Cascabulho (Plataforma de Citometria de Fluxo); Fátima Cruz, Iolanda Deolinda, Juliane Siqueira, Dr^a Ester Mota e Dr Marcelo Pelajo (Laboratório de Patologia); Paula Finamore e Dr Otacílio Moreira (Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas). Além deles, também as colaboradoras Dr^a Maria Terezinha Bahia da Universidade Federal de Ouro Preto, e a Dr^a Núbia Boechat de Farmanguinhos/Fiocruz. Incluo no agradecimento a pós-graduação em Biologia

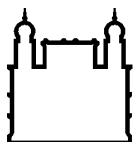
Parasitária, seus professores, coordenadores, e principalmente a tão zelosa secretária Rita Gomes.

Agradeço imensamente o Dr Pascal Mäser e Dr Marcel Kaiser pela parceria no programa Swiss Faperj e a inesquecível oportunidade de estudar e trabalhar no Swiss Tropical and Public Health Institute (Basileia, Suíça). O quase um ano de intercâmbio me rendeu aprendizado, bons momentos e amigos. Obrigada Amélie Ritschl, Anna Fesser, Annabelle Walz, Christian Scheurer, Christin Gumpp, Christina Kunz, Christine Mensch, Fabian Haas, Abdelhalim Mahmoud, Dr Kirsten Gillingwater, Marina Gysin, Dr Matthias Rottmann, Mélanie Pellisson, Michaela Zwyer, Monica Cal, Natalie Wiedemar, Dr Remo Schmidt, Romina Rocchetti, Dr Sergio Wittlin, Silvan Hälg, Sonja Märki, Thierry Brun e Ursula Lehmann por me fazerem sentir em casa, me ajudar com o idioma e os dialetos e, claro, por dividirem comigo o conhecimento científico. A mais, de presente da temporada trago em mim a doce lembrança de tantos outros que me deram um pedacinho de seus países, e escolhi os queridos amigos Adithya Pradyumna, Joaquin Gutierrez, Maritza Culma, Marta Palmeirim e Martin Matuska para representar a todos.

Ainda sobre aqueles presentes que recebi na vida e me devotam sua amizade sincera, preciso agradecer aos doutores Adriano Gomes, Clarissa Cunha, Geovane Lopes, LÍndice Mitie, Manoela Heringer, Marcela Granato, Maria Fantinatti, Moyra Portilho, Nathália Portilho e Raquel Ferraz. Além deles, não poderia deixar de mencionar Bianca Ferraz, Isabela Dias, Gabriela Apolonio, Kyssia Paiva, Samuel Horita e Wolfgang Pajenk.

Finalmente, e igualmente relevante, agradeço o apoio financeiro da Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Onde meus talentos e paixões encontram as necessidades do mundo, lá está o
meu caminho, o meu lugar.”
Aristóteles



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

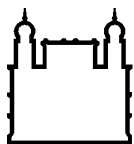
REPOSICIONAMENTO E COMBINAÇÃO DE FÁRMACOS PARA TERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS E O POTENCIAL IMPACTO DE COINFEÇÃO HELMÍNTICA NA INFEÇÃO POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Marianne Rocha Simões Silva

A busca por novos tratamentos contra o *Trypanosoma cruzi* foi abordada utilizando triagem fenotípica de compostos, reposicionamento de fármacos e combinação. O impacto da coinfeção por helmintos foi avaliado no curso da infecção experimental por *T. cruzi* e na terapia com benznidazol. A atividade tripanossomicida de metronidazol (Mtz), imatinib (IMB) e levamisol (Lms) foi investigada *in vitro* e *in vivo*, bem como novos derivados de IMB e inibidores da biossíntese de lipídios. Um modelo experimental de coinfeção para doença de Chagas foi desenvolvido utilizando *Schistosoma mansoni*. O uso de Mtz até 1000 mg/Kg não teve efeito na supressão da parasitemia de camundongos em comparação com Bz 100 mg/Kg, mas a combinação Bz 10 + Mtz 250 mg/Kg preveniu a mortalidade (70%) e mostrou proteção contra alterações cardíacas desencadeadas por *T. cruzi*. Estudos *in vitro* demonstraram que o IMB foi moderadamente ativo contra diferentes cepas e formas de *T. cruzi*. A combinação IMB + Bz foi aditiva *in vitro*. Quatorze novos derivados do IMB foram selecionados; a molécula **3e** foi tão potente quanto Bz contra *T. cruzi*, mas apresentou baixo índice de seletividade (IS). Lms (10 - 0,5 mg/Kg) não diminuiu as taxas de parasitemia nem mortalidade no modelo murino de infecção aguda por *T. cruzi*. Combinação de diferentes doses de Lms + Bz 10 mg/Kg mostrou redução parcial da parasitemia e promoveu a sobrevivência dos animais, o que pode estar relacionado à modulação da resposta imune do hospedeiro. Em relação aos inibidores da biossíntese lipídica, seis dos 15 apresentaram $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ em epimastigotas. Ensaios em amastigotas intracelulares e células hospedeiras de mamífero mostraram que Ro48-8071 (IS = 13,7) e cloridrato de tomatidina (TH) (IS = 41,2) poderiam ser dirigidos para ensaios combinatórios. Apenas a interação TH + posaconazol (Posa) foi sinérgica (média $\Sigma\text{FICI} = 0,2$). Os ensaios *in vivo* demonstraram ausência de atividade antiparasitária de TH (0,5-5 mg/Kg) na infecção experimental por *T. cruzi*, enquanto Posa 1,25 e 10 mg/kg parcialmente (80%) e completamente (> 99%) suprimiram a parasitemia, respectivamente, e a dose mais alta atingiu 40% de sobrevida. Observou-se redução parcial da parasitemia (> 60%) e proteção contra mortalidade (> 40%) com THs + Posa 1,25 mg/Kg, sendo a relação 1Posa: 3TH a melhor combinação. Os estudos de coinfeção foram desenvolvidos com a fase aguda experimental do *T. cruzi* (Tc) frente à esquistossomose nas fases inicial (Sm1) e tardia (Sm2). Parasitemia foi a mesma em Tc e Tc + Sm1; Tc + Sm2 exacerbou a carga parasitária. Alterações cardíacas comuns no Tc foram menos incidentes com a presença do Sm, apresentando menor gravidade, principalmente no Tc + Sm2. Análises histopatológicas revelaram que animais infectados com Tc apresentaram infiltrado mononuclear e ninhos de amastigotas no coração, e camundongos infectados com Sm apresentaram intensa inflamação, granuloma e pigmentos esquistossomóticos no fígado. A detecção de populações de células TCD4 e TCD8 demonstrou que a coinfeção se comportou como a monoinfecção por Tc. O tratamento com Bz apresentou a mesma redução de parasitemia em Tc e ambos Tc + Sm. O tratamento reduziu a inflamação nos tecidos cardíaco e hepático, demonstrado por microscopia de luz. Bz reverteu os eventos inflamatórios em Tc e Tc + Sm1, mas apresentou menor efeito em Tc + Sm2. Triagem fenotípica, reposicionamento de medicamentos e combinação são abordagens validadas para a descoberta de drogas em DC. Além disso, é relevante avaliar as comorbidades em portadores da doença de Chagas, uma vez que podem impactar na condição clínica, no curso do tratamento e na qualidade de vida dos indivíduos afetados.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

DRUG REPOSITIONING AND COMBINATION FOR CHAGAS DISEASE THERAPY AND THE POTENTIAL IMPACT OF HELMINTH COINFECTION ON *TRYPANOSOMA CRUZI* INFECTION

ABSTRACT

PHD THESIS IN PARASITE BIOLOGY

Marianne Rocha Simões Silva

The search for new alternative treatments against *Trypanosoma cruzi* was aimed using phenotypic screening of compounds, drug repurposing and combination. The impact of helminth coinfection was assessed in the course of experimental *T. cruzi* infection and on therapy with benznidazole (Bz). The trypanocidal activity of metronidazole (Mtz), imatinib (IMB) and levamisole (Lms) was investigated *in vitro* and *in vivo*, as well as of novel IMB derivatives and inhibitors of lipid biosynthesis. An experimental model of coinfection for Chagas disease was developed using *Schistosoma mansoni*. The use of Mtz up to 1000 mg/Kg had no effect in suppressing mice parasitemia in comparison to Bz 100 mg/Kg, but the combo Bz 10 + Mtz 250 mg/Kg prevented mortality (70%) and showed protection against cardiac alterations triggered by *T. cruzi*. *In vitro* studies demonstrated that IMB was moderately active against different strains and forms of *T. cruzi*. The combo IMB + Bz was additive *in vitro*. Novel 14 derivatives of IMB were screened; molecule **3e** was as potent as Bz on *T. cruzi* but had low selectivity index (SI). Lms (10 - 0.5 mg/Kg) did not decrease parasitemia nor mortality rates in murine model of acute CD infection. Combination of different doses of Lms + Bz 10 mg/Kg showed partial parasitemia reduction and promoted animal survival, which could be related to the modulation of the host immune response. Regarding inhibitors of lipid biosynthesis, six out of 15 displayed $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$ on epimastigotes. Assays on intracellular amastigotes and mammalian host cells showed that only Ro48-8071 (SI = 13,7) and tomatidine hydrochloride (TH) (SI = 41,2) could be directed to combinatory assays. Only TH + posaconazole (Posa) interaction was synergistic (mean $\Sigma\text{FICI} = 0,2$). Following *in vivo* assays demonstrated lack of antiparasitic activity of TH (0,5 - 5 mg/Kg) in acute experimental *T. cruzi* infection, while Posa 1,25 and 10 mg/Kg partially (80 %) and completely (> 99 %) suppressed parasitemia, respectively, and the higher dose reached 40 % of survival. Partial parasitemia reduction (> 60 %) and protection against mortality (> 40 %) was observed with THs + Posa 1,25 mg/Kg, being the ratio 1Posa:3TH the best combo. Studies of coinfection were designed with experimental acute phase of *T. cruzi* (Tc) facing schistosomiasis in early (Sm1) and late (Sm2) phases. Parasitemia was the same in Tc and Tc + Sm1; Tc + Sm2 had exacerbated parasite load. Cardiac alterations common in Tc were less incident with the presence of Sm, displaying lower severity, especially in Tc + Sm2. Histopathological analyses revealed that animals infected with Tc presented mononuclear infiltration and amastigote nests in the heart, and mice infected with Sm had intense inflammation, granuloma and schistosomal pigments in liver. Detection of TCD4 and TCD8 cell populations demonstrated that coinfection behaved like Tc mono-infection. Bz treatment presented the same parasitemia reduction in Tc and both Tc + Sm. The treatment reduced inflammation in cardiac and hepatic tissues, shown by light microscopy. Bz reverted the inflammatory events in Tc and Tc + Sm1 but showed lower effect on Tc + Sm2. Phenotypical screening, drug repositioning and combination are validated approaches for drug discovery in CD. Furthermore, it is relevant to evaluate chagasic patients for comorbidities, once it can impact on clinical condition, course of treatment, and life quality of the affected individuals.

ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Doenças negligenciadas	17
1.2 Doença de Chagas	18
1.2.1 Epidemiologia	18
1.2.2 Parasitologia	20
1.2.3 Aspectos gerais clínicos, imunológicos e diagnósticos ...	22
1.2.4 Controle e tratamento	24
1.2.5 Busca de alternativas terapêuticas	26
1.3 O impacto de comorbidades na doença de Chagas: estabelecendo o modelo de coinfeção com <i>Schistosoma mansoni</i>	35
1.4 Esquistossomose	36
1.4.1 Epidemiologia	36
1.4.2 Parasitologia	37
1.4.3 Aspectos gerais clínicos, imunológicos e acesso ao diagnóstico	39
1.4.4 Tratamento e controle	41
1.5 Justificativa	42
2 OBJETIVOS	44
2.1 Objetivo Geral	44
2.2 Objetivos Específicos	44
3 ARTIGOS	45
3.1 Artigo 1 (publicado)	46
3.2 Artigo 2 (aceito para publicação)	55
3.3 Artigo 3 (aceito para publicação)	84
3.4 Artigo 4 (a ser submetido)	106
3.5 Artigo 5 (a ser submetido)	128
4 DISCUSSÃO	151

5	CONCLUSÕES	171
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	173
APÊNDICE A -	RESULTADOS SUPLEMENTARES REFERENTES AO	
	ARTIGO 3 (ITEM 3.3)	196
APÊNDICE B -	LICENÇAS CONCEDIDAS PELO COMITÊ DE ÉTICA NO	
	USO DE ANIMAIS (CEUA/IOC)	198

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Sobreposição geográfica de doenças negligenciadas no mundo: aproximadamente um bilhão de pessoas é infectada por mais dessas enfermidades (adaptação da figura de Molly Brady, Emory University, obtido em Molyneux, Hotez e Fenwick 2005).....	18
Figura 2 - Estimativa atual da população infectada pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> (adaptado de Patterson e Guhl 2010).....	20
Figura 3 - Esquema ilustrativo do ciclo de <i>Trypanosoma cruzi</i> (adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention 2012).....	21
Figura 4 - Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas: benznidazol (A) e nifurtimox (B) (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).	25
Figura 5 - Estrutura química do posaconazol (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).	29
Figura 6 - Estrutura química do metronidazol (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).	32
Figura 7 - Estrutura química do levamisol (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).	32
Figura 8 - Estruturas químicas do mesilato de imatinib (A) (fonte: PubChem – Open Chemistry Database) e derivados (B) produzidos no Laboratório de Síntese de Fármacos (Farmanguinhos/ Fiocruz).	33
Figura 9 - Estrutura química do cloridrato de tomatidina (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).....	35
Figura 10 - (A) Prevalência da esquistossomose observada no Brasil entre 2005 e 2009 (dados do Programa de Controle da Esquistossomose - PCE, Ministério	

da Saúde); (B) estimativa da distribuição espacial da prevalência da infecção por *Schistosoma mansoni* (adaptado de Scholte et al. 2014). 37

Figura 11 - Esquema ilustrativo do ciclo de *Schistosoma mansoni*. (adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention 2012)..... 38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Perfil do produto alvo do DNDi (adaptado de DNDi 2015)..... 27

Tabela 2 - Critérios e parâmetros de seleção e determinação de compostos “hit” e “lead” para a doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset 2014)..... 28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Bz	Benznidazol
DPMK	Drug metabolism and pharmacokinetics: metabolismo de fármaco e farmacocinética
DNDi	Drugs for Neglected Diseases Initiative
ex.	exemplo
et al.	e colaboradores
Fexi	Fexinidazol
IMB	Imatinib
Kg	quilograma
Lms	Levamisol
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
mg	miligrama
mg/Kg	miligrama por quilograma
mL	mililitro
Mtz	Metronidazol
Nf	Nifurtimox
Posa	Posaconazol
OMS	Organização Mundial de Saúde
TH	Cloridrato de tomatidina
TK	Tirosina cinase

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças negligenciadas

Em países em desenvolvimento existem extensas áreas de desigualdade social que exibem baixíssimos índices de desenvolvimento humano, e as pessoas sobrevivem em condições miseráveis. Quando presente, o saneamento básico é deficiente, o acesso à educação é precário, e o sistema de saúde pública é incapaz de atender as demandas apropriadamente, deixando a população completamente negligenciada (Hotez et al. 2016; Hotez 2018). Nesses ambientes, a prevalência de doenças infecciosas é uma realidade decorrente do descaso acerca das políticas públicas em saúde e educação, somado à insuficiente vigilância sanitária e epidemiológica em conjunto com o desinteresse das indústrias farmacêuticas em prover novos medicamentos, vacinas e testes diagnósticos adequados e seletivos. Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica tais enfermidades como doenças negligenciadas e mobiliza intensos esforços internacionais para reverter esse quadro e controlar tais infecções, investindo assim também em reduzir a pobreza e a desigualdade entre as populações (WHO 2012, 2014).

As doenças negligenciadas são causadas por vírus, bactérias, protozoários, helmintos e animais peçonhentos. Apesar de sua notificação ser compulsória, de um modo geral não é realizada, uma vez que os métodos diagnósticos destas patologias são limitados, bem como seus tratamentos. A escassez de dados epidemiológicos contribui para o cenário de negligência ao demonstrar números inferiores e irrealistas de casos e impedir a ação adequada dos agentes de saúde, bem como a implementação de medidas profiláticas (Hotez et al. 2016; Hotez 2018). Igualmente desconhecida é a ocorrência de comorbidades (Figura 1), o que complica a abordagem adequada dos pacientes, uma vez que, na maioria dos casos, não se sabe o impacto de uma infecção ou outro agravo não infeccioso (ex. hipertensão, diabetes, dentre outras) sobre a outra enfermidade, ou mesmo, e talvez mais importante, como proceder em relação ao tratamento (qual tratar primeiro ou tratar simultaneamente), tendo em vista a melhor alternativa para o indivíduo acometido (Osakunor, Sengeh & Mutapi 2018).

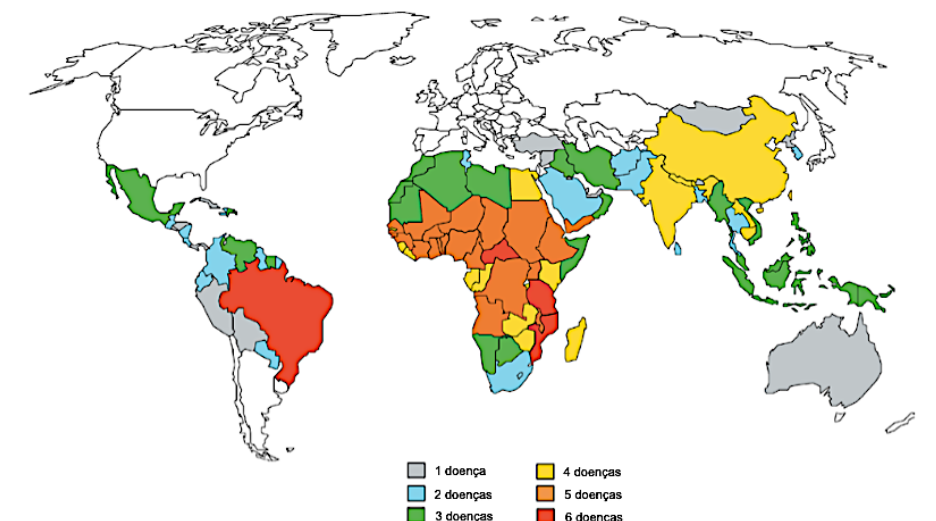


Figura 1 - Sobreposição geográfica de doenças negligenciadas no mundo: aproximadamente um bilhão de pessoas é infectada por mais de uma dessas enfermidades (adaptação da figura de Molly Brady, Emory University, obtido em Molyneux, Hotez e Fenwick 2005).

Neste contexto, a doença de Chagas figura como patologia negligenciada que necessita de novos tratamentos e métodos diagnósticos. Além disso, requer a constante avaliação dos casos de modo coletivo e, sobretudo, individual, para acessar a ocorrência de reinfecções, coinfeções e comorbidades, e até mesmo o impacto destes eventos sobre o curso e terapia da doença de Chagas (Dias et al. 2016). Considerando ainda a frequência de casos em bolsões de extrema pobreza e poucas condições sanitárias, é possível ainda prever que comorbidades helmínticas sejam recorrentes, uma vez que são deteriorantes, apesar de muitas vezes autolimitantes, e difíceis de prevenir e controlar em ambientes com baixa educação e pouca infraestrutura (Lustigman et al. 2012; Coura 2013; Coura, Viñas & Junqueira 2014). A esquistossomose figura no cenário de parasitoses helmínticas que representam risco adicional aos afetados pela doença de Chagas, exibindo, inclusive, dois momentos parasito-imunológicos distintos e progressivamente debilitantes (McManus et al. 2018).

1.2 Doença de Chagas

1.2.1 Epidemiologia

A doença de Chagas, também denominada tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A doença recebe o nome de seu descobridor, o médico mineiro Dr Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas que em 1909,

em um feito único na história da medicina internacional, determinou sozinho o agente etiológico, seu ciclo biológico, hospedeiros, sua transmissão e respectivos vetores, descrevendo inclusive o quadro clínico da patologia de modo minucioso (Chagas 1909).

A doença de Chagas está presente no continente americano há pelo menos 9000 anos, como evidenciado em exames de DNA de múmias andinas (Aufderheide et al. 2004). Por séculos a doença se manteve estritamente rural e antes de ser uma antroponose, predominava exclusivamente entre animais selvagens, sendo mais tarde transmitida para animais domésticos e, finalmente, para o homem (Araújo et al. 2009). As mudanças socioeconômicas, a urbanização e o desflorestamento influenciaram o cenário epidemiológico da DC e esta se tornou, há algumas décadas, igualmente frequente em ambientes urbanos e peri-urbanos (Coura, Viñas & Junqueira 2014).

Endêmica em 21 países da América Latina, ocorre naturalmente do sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina. A transmissão do *T. cruzi* majoritariamente acontece pela via vetorial, seja ela clássica por insetos triatomíneos da família Reduviidae, popularmente denominados “barbeiros”, ou oral, pela ingestão de alimentos contaminados com fezes infectadas e/ou os próprios insetos, em determinadas regiões como no interior da Venezuela e na Amazônia brasileira, onde a via vetorial oral se destaca como grave problema de saúde pública e de boas práticas de fabricação (Coura & Junqueira 2015). Em outras regiões, como norte da Argentina e Uruguai, a transmissão vertical ou materno-fetal (via congênita) incide na maioria dos novos casos (Prata 2001; Rassi, Rassi & Marin-Neto 2010). Outras formas de transmissão descritas compreendem transfusão de sangue contaminado e transplante de órgãos provenientes de portadores chagásicos. Estas vias são pouco frequentes na América Latina devido ao intenso controle de bancos de sangue e transplante de órgãos estabelecidos pelos governos de cada país, mas representam ainda considerável risco em países não endêmicos na Ásia, Europa e Oceania, sendo inclusive responsáveis pelos crescentes casos registrados nesses locais (Gascon, Bern & Pinazo 2010). Essa tendência no cenário epidemiológico da DC vem sendo observada aproximadamente nos últimos dez anos, em grande parte decorrente do crescente movimento migratório global (Figura 2) (revisado em Patterson & Guhl 2010). Cerca de oito milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo *T. cruzi* e outras dez milhões vivem sob risco de infecção, sendo registradas cerca de dez mil mortes por ano (WHO 2015).

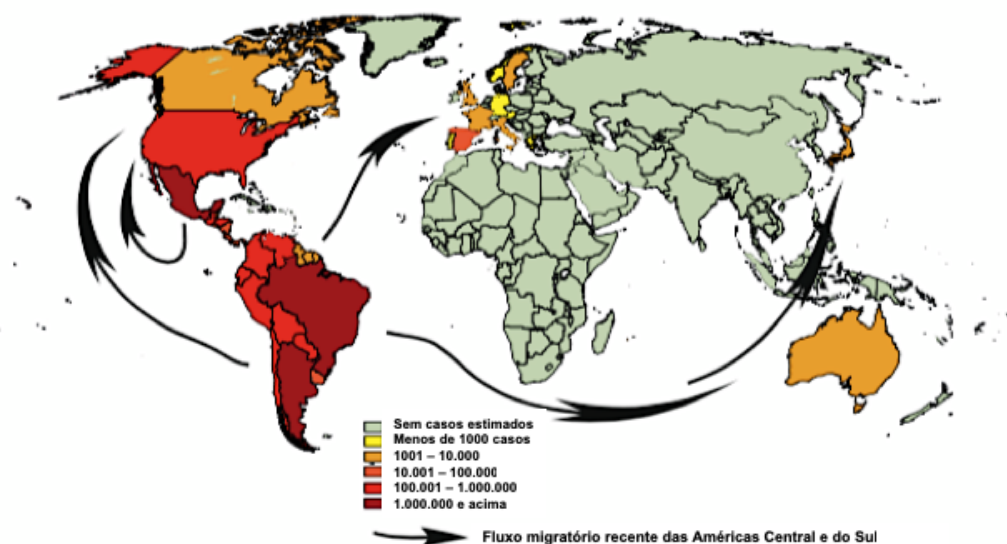


Figura 2 - Estimativa atual da população infectada pelo *Trypanosoma cruzi* (adaptado de Patterson e Guhl 2010).

1.2.2 Parasitologia

O protozoário unicelular flagelado *T. cruzi* é um tripanossomatídeo heteroxeno, classificado em seis “discrete typing units” (DTUs), determinadas por genotipagem multilocal (Zingales et al. 2012). As DTUs se distribuem pelo território endêmico e podem ser mais prevalentes em uma ou outra região, daí a importância do estudo com múltiplas cepas pertencentes às diferentes classificações. Essa estratégia permite abordar o máximo de aspectos possíveis inerentes ao *T. cruzi* que sejam relevantes à infectividade e às relações com os hospedeiros vertebrado e invertebrado, bem como ao perfil de suscetibilidade a fármacos (Brenner & Chiari 1963; Zingales et al. 2012, 2014).

O parasita da doença de Chagas apresenta distintas formas durante seu ciclo biológico (Figura 3). No intestino do inseto triatomíneo, seu hospedeiro invertebrado, está presente o epimastigota, forma multiplicativa (por fissão binária) e que se caracteriza microscopicamente por ser uma forma delgada e flagelada, e pela presença do cinetoplasto anterior ao núcleo. Devido ao ambiente em que se encontra, o epimastigota possui metabolismo e reserva energética diferente das outras formas, dentre outras adaptações inerentes que possibilitam a vida no interior do barbeiro (Gonçalves et al. 2018). Dados recentes apontam para a capacidade infectante destas formas em modelos *in vitro* e *in vivo* (Kessler et al. 2017)

DOENÇA DE CHAGAS

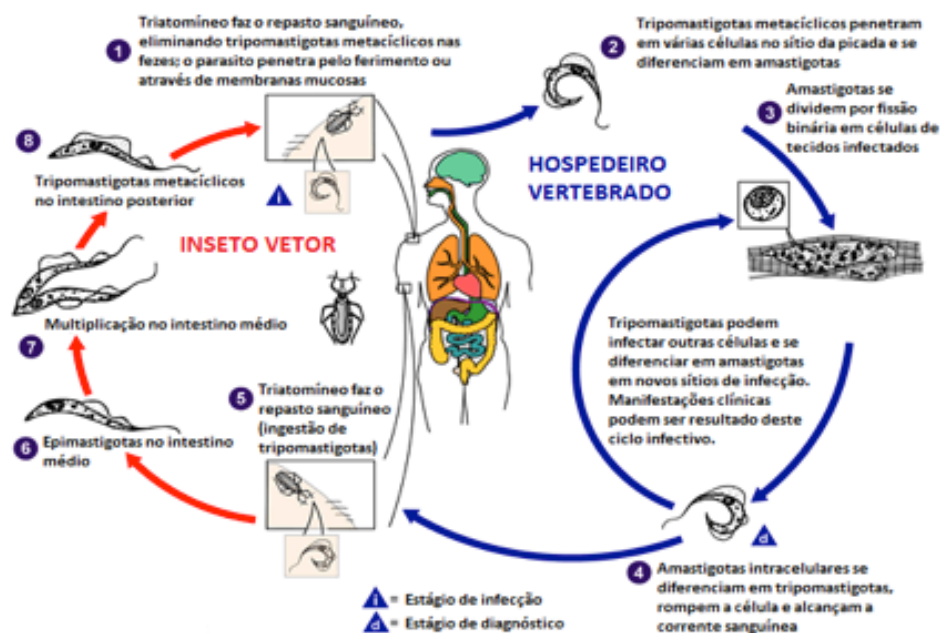


Figura 3 - Esquema ilustrativo do ciclo de *Trypanosoma cruzi* (adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention 2012).

Após se replicar, estímulos ainda não esclarecidos direcionam os epimastigotas à porção final do intestino do vetor, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicas, ainda flagelados e mais delgados. Estes apresentam cinetoplasto posterior ao núcleo e são as formas majoritariamente infectantes para os hospedeiros vertebrados (Gonçalves et al. 2018).

No momento do repasto sanguíneo do barbeiro infectado, este suga o sangue do mamífero (no caso, o homem), seguindo-se a eliminação de fezes e urina contendo as formas metacíclicas. De igual modo, durante o repasto sanguíneo o triatomíneo pode adquirir as formas tripomastigotas sanguíneas caso o mamífero esteja infectado por *T. cruzi*. Assim, as fezes/urina contendo tripomastigotas metacíclicos, portanto, são depositadas na pele do homem e forma-se uma solução de continuidade que permite a entrada dos parasitos no organismo do hospedeiro vertebrado. A seguir, qualquer célula nucleada pode ser infectada, e assim diversas células são invadidas, formando-se o vacúolo parasitóforo intracelular que contém os tripomastigotas metacíclicos mantendo-os isolados transitoriamente do citoplasma. Neste microambiente, os parasitos conseguem “escapar” do sistema imune do hospedeiro. Após a lise da membrana do fagossomo, as formas tripomastigotas finalizam sua diferenciação em amastigotas livres no citoplasma da célula hospedeira. As amastigotas são formas arredondadas, com flagelo curto e cinetoplasto localizado em

posição central na célula, mas anterior ao núcleo. (De Souza 2014; Campo, Martins-Teixeira & Carvalho 2016).

As amastigotas passam então por vários ciclos de divisão celular (fissão binária) e, por estímulos até agora não completamente identificados, interrompem a multiplicação, tendo início a transformação em tripomastigotas sanguíneos, formas delgadas e flageladas que se movimentam ativamente e culminam na lise da célula hospedeira que os abriga. O rompimento das células infectadas libera os parasitos para o meio extracelular e através da corrente sanguínea e linfática, vão infectar novas células nucleadas, retomando o ciclo intracelular descrito acima (De Souza 2014; Campo, Martins-Teixeira & Carvalho 2016).

Frente a resposta imune inata e adquirida competentes de hospedeiros vertebrados, há o controle do parasitismo intracelular e circulante. Porém, na ausência de tratamento etiológico nessa fase inicial de infecção, ninhos residuais de parasitos podem ser localizados em diversos órgãos, podendo gerar recidiva no curso de imunodeficiências (ex. por HIV), ou pelo uso de imunossupressores (ex. corticoides) (Cardillo et al. 2015; Flávia-Nardy et al. 2015).

1.2.3 Aspectos gerais clínicos, imunológicos e diagnósticos

Após alguns dias (podendo se estender por até quatro semanas) da infecção primária, o indivíduo desenvolve a fase aguda da doença, e nela poderá apresentar ou não um conjunto de sinais e sintomas leves que se assemelha ao início de muitas doenças infecciosas, como, por exemplo, uma gripe (Prata 2001; Rassi, Rassi e Marin-Neto 2010). Nesta fase de curta duração (até oito semanas), febre, dores no corpo, linfadenopatia e discreta hepatoesplenomegalia, podem ser observadas nos pacientes com sintomatologia aguda, e são decorrentes da atuação da resposta imune do hospedeiro tentando combater o patógeno (Dutra et al. 2014). A resposta imune inata se inicia com a participação de células sentinelas (ex. NK, macrófagos e monócitos), além de mediadores inflamatórios (Cardillo et al. 2015). Neste ambiente já tem início a resposta imune adaptativa prevalentemente Th1, com elevada expressão de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, TNF e IFN- γ , e recrutamento de componente celular mono-linfocitário, como linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ (Dutra et al. 2014; Cardillo et al. 2015). O equilíbrio da interação entre o hospedeiro e o parasita resulta numa mudança no perfil celular e de citocinas como, por ex., produção de IL-10 e IL-17, tal como participação de linfócitos T_{reg} contribuindo para a homeostasia dos tecidos e órgãos acometidos (Dutra et al. 2014; Cardillo et al. 2015). Assim vai

ocorrendo a transição da fase aguda para a fase crônica, sem que o paciente perceba que se estabeleceu uma doença incurável, caso não tenha sido devidamente tratado com os fármacos disponíveis (Dutra et al. 2014).

Tal como na fase aguda, a maioria dos pacientes vivencia uma doença silenciosa, já chamada forma indeterminada desde Carlos Chagas. Essa forma é somente evidenciada pela sorologia positiva e sutis alterações em exames eletrocardiográficos, que exigem profissional experiente e especializado para identificar sua ocorrência (Prata 2001; Rassi, Rassi e Marin-Neto 2010). O paciente assim permanece a prazo indeterminado, podendo alcançar três ou quatro décadas sem nenhum sinal da infecção e até mesmo morrer sem saber que era portador do *T. cruzi* (Prata 2001; Rassi, Rassi & Marin-Neto 2010). Por outro lado, uma pequena parcela dos pacientes (20-30 %) evolui, após anos ou décadas, para a forma cardíaca e/ou digestiva, apresentando acometimento cardíaco e/ou digestivo de leve a grave (Prata 2001; Rassi, Rassi & Marin-Neto 2010). As formas clínicas mencionadas são decorrentes do desbalanço entre a resposta imune do hospedeiro e pela presença, mesmo que subpatente, do parasita, sendo as citocinas pró-inflamatórias anteriormente citadas produzidas ininterruptamente (Dutra et al. 2014). Assim, a progressiva resposta inflamatória crônica resulta em dano às células parasitadas ou não (presentes na circunvizinhança), causando danos irreversíveis e incapacitantes, com a hipertrofia dos órgãos acometidos (cardiomegalia, megaesôfago e megacólon, estes últimos dois decorrentes de denervação), até quadros mais graves como acalasia (dilatação do esôfago e interrupção do peristaltismo), falência cardíaca e morte súbita (Prata 2001; Rassi, Rassi & Marin-Neto 2010).

Quase a totalidade dos pacientes vive em regiões de muita pobreza e baixo acesso aos parques serviços de saúde disponíveis. Os raros sinais e sintomas durante a fase aguda geram confusão no diagnóstico, uma vez que, como mencionado acima, se assemelham a outras doenças infecciosas que muitas vezes são também endêmicas nas regiões de prevalência da doença de Chagas, como malária, leishmaniose, dengue e febre amarela (Coura 2013). A situação não é diferente para pacientes na fase crônica, pois sendo uma doença silenciosa, o eventual diagnóstico muitas vezes advém da demanda de uma empresa a um novo funcionário, ou ocasionais estudos epidemiológicos e/ou ensaios clínicos, ou ainda no ato de doação de sangue (Coura 2013).

O II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas de 2015 (Dias et al. 2016), um documento produzido a partir da estreita parceria entre a Sociedade Brasileira de

Medicina Tropical e o Ministério da Saúde, dispõe sobre prevenção, controle, tratamento e diagnóstico da doença de Chagas, e estabelece medidas integrativas que proporcionam o melhor cuidado e atenção aos portadores do parasita. Neste documento também consta o manejo de gestantes e crianças, populações que exigem um cuidado especial por parte dos sistemas públicos de saúde, e que deveriam, inclusive, receber mais atenção nos ensaios de quimioterapia experimental. No que tange o diagnóstico, determina-se o parasitológico (busca ativa de parasitas no sangue periférico) como o mais indicado para a fase aguda, e menos para a fase crônica, dado que a parasitemia é subpatente nesse momento da infecção. Por conseguinte, são recomendados os testes sorológicos para a fase crônica, bem como os testes de avaliação da função cardíaca (ex. eletrocardiograma) e diagnóstico por imagem (ex. radiografia simples de tórax e exame contrastado de esôfago e intestino).

1.2.4 Controle e tratamento

Uma vez que apresenta diversas formas de infecção, o controle da doença de Chagas deve ser amplo e abrangente. É fundamental que seja feito o controle vetorial, pois a transmissão por meio das fezes dos triatomíneos é prevalente na maioria das áreas endêmicas (Coura 2013). Contudo, o problema atual, principalmente no Brasil, encontra-se na infecção por via oral, sendo uma medida essencial o controle na qualidade de produção e armazenamento de alimentos que podem ser alvos de esconderijo do barbeiro. Um dos exemplos de controle na cadeia produtiva de alimentos é o branqueamento ou pasteurização da polpa e extrato do açaí antes de seu consumo (Coura & Junqueira 2015). Além disso, a investigação em gestantes em áreas endêmicas ou emigradas delas é vital para que se possa realizar o diagnóstico da mãe no exame pré-natal, bem como do bebê, e o tratamento assim que seja indicado (Dias et al. 2016). Inclusive é imprescindível a triagem de doadores de órgãos e sangue, medida crucial já fortemente divulgada e realizada nos países endêmicos e que necessita maior atenção e providência nos países onde já há registros de casos importados (Gascon, Bern & Pinazo 2010).

Tão importante quanto os controles mencionados acima são as iniciativas governamentais de investimentos em infraestrutura domiciliar e municipal, provendo a população com melhores condições de moradia, para acabar com os focos reprodutivos dos vetores (Rassi, Rassi & Marin-Neto 2010; Hotez 2018). Ademais, as pessoas precisam ter acesso a serviços de saúde pública de qualidade; portanto, cabe aos gestores organizar adequadamente a distribuição de capital para o sistema,

capacitar profissionais da área e disponibilizar métodos de diagnóstico e tratamento para todo o território de sua jurisdição (Hotez 2018).

No que diz respeito ao tratamento, os portadores do *T. cruzi* contam com duas alternativas terapêuticas: o benznidazol (derivado nitroimidazólico) e o nifurtimox (nitrofurano) (Figura 4), introduzidos na clínica há mais de cinco décadas (Brener 1962). Menos de 1 % dos pacientes tem acesso aos medicamentos distribuídos pela OMS, mas além de sua baixa produção, a ocorrência de graves efeitos adversos, como dores musculares e abdominais, alterações no hemograma, anorexia, rash cutâneo e polineurite, muitas vezes resulta na não adesão ao tratamento. No Brasil, o medicamento de primeira linha para a doença de Chagas é o benznidazol (Coura 2009).

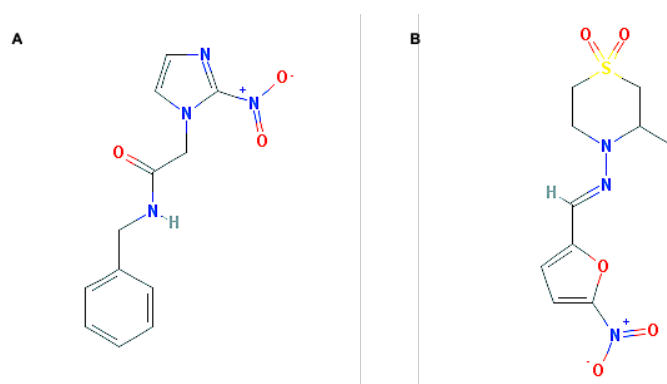


Figura 4 - Estruturas químicas dos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas: benznidazol (A) e nifurtimox (B) (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).

Além dos efeitos adversos, há a ocorrência natural de cepas do parasita resistentes aos medicamentos (Filardi & Brener 1987), ademais, eles não são eficazes na fase crônica tardia da doença de Chagas, momento em que a maioria dos casos é diagnosticado (Rassi, Rassi & Marin-Neto 2010).

As diversas limitações inerentes ao tratamento exigem urgentemente a descoberta de novas alternativas que possam suprir as necessidades dos portadores. Mas a busca por novos tratamentos não deve visar apenas a cura estéril, ou seja, a eliminação total do parasita do organismo hospedeiro, mas também a melhoria da qualidade de vida do paciente e de sua sintomatologia crônica, como por ex., reduzir a progressão da cardiomiopatia chagásica crônica decorrente de uma resposta inflamatória desbalanceada, mas mantida pela carga residual do parasito. Assim, com a quimioterapia experimental pretende-se reduzir a carga parasitária e conter o processo inflamatório, uma vez que isso contribuirá para desacelerar a progressão da doença e aumentar a expectativa de vida, permitindo ao paciente uma vida mais

próxima da normalidade possível, especialmente viabilizando sua reinserção social, inclusive no mercado de trabalho (Coura 2009; Scarim et al. 2018).

1.2.5 Busca de alternativas terapêuticas

Por muito tempo pensou-se que a doença de Chagas era somente de caráter autoimune, e isso impôs um atraso na busca por novos medicamentos (Chatelain 2016). Com o tempo, demonstrou-se que o parasita continua presente no hospedeiro, sendo responsável pela ativação constante de uma resposta imune desbalanceada pela condição de ativação crônica, resultando na agressão extensiva e progressiva aos tecidos e órgãos, em especial o coração (Dutra et al. 2014). A partir dessa mudança de dogma, as buscas por novos medicamentos foram reavivadas, seja com foco no próprio *T. cruzi* residente no hospedeiro, seja no âmbito de modular a fisiologia do hospedeiro para que ele possa combater a infecção por esse protozoário sem causar danos a si (Lannes-Vieira et al. 2010).

As abordagens atuais em quimioterapia experimental, portanto, independente do foco de pesquisa, envolvem essencialmente a triagem fenotípica a partir de quimiotecas (naturais e de produtos sintéticos), a geração de inibidores/agonistas/antagonistas de alvos moleculares com especificidade às moléculas do parasito, o reposicionamento de medicamentos licenciados e a combinação de compostos, sejam eles novas substâncias ou fármacos comercializados (Coura 2009; Chatelain 2016; Scarim et al. 2018). Estas estratégias bem validadas são amplamente utilizadas nos estudos sobre novas terapias para doenças negligenciadas, igualmente para a doença de Chagas, e o presente trabalho retrata sua aplicabilidade, autenticando as metodologias bem difundidas pelos pares na comunidade científica.

No que se refere à busca de novos medicamentos, é fundamental trabalhar de acordo com o que é estabelecido para perfil de produto alvo (do inglês “target product profile”) pela OMS e “Drugs for Neglected Diseases Initiative” (DNDi) (Tabela 1) (DNDi 2015). Nessa tabela encontram-se as características essenciais de novos fármacos para doença de Chagas que, assim, permitem o direcionamento adequado dos estudos de quimioterapia experimental, atendendo às demandas dos distintos grupos de portadores, bem como aos requisitos estabelecidos pela OMS.

Tabela 1 - Perfil do produto alvo do DNDi (adaptado de DNDi 2015).

	Aceitável	Ideal
POPULAÇÃO ALVO	Crônica	Crônica e aguda
DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA	Todas as regiões	Todas as regiões
EFICÁCIA CLÍNICA	Não inferior ao benznidazol na dose padrão em todas as regiões (parasitológica)	Superior à dose padrão do benznidazol para diferentes fases da doença (aguda e crônica) (parasitológica)
SEGURANÇA	Superior ao benznidazol na frequência do tratamento definitivo, descontinuações por indicação médica (clínica e laboratorial)	Superior ao benznidazol na frequência do tratamento definitivo, descontinuações por indicação médica (clínica e laboratorial)
CONTRAINDICAÇÕES	Gravidez	Sem contraindicações
PRECAUÇÕES	Ausência de: genotoxicidade e de potencial pró-arrítmico	Ausência de: genotoxicidade, de teratogenicidade e de potencial pró-arrítmico
INTERAÇÕES	Ausência de interações clínicas significativas com medicamentos antiarrítmicos e anticoagulantes	Nenhuma interação clínica significativa
APRESENTAÇÃO	Oral / Parenteral (curto período, casos graves), adaptado à idade	Oral, adaptado à idade
ESTABILIDADE	3 anos em zona climática IV	5 anos em zona climática IV
REGIME TERAPÊUTICO	Oral: qualquer duração Parenteral: < 7 dias	< 30 dias
CUSTOS	O menor possível	Tratamentos atuais

A triagem fenotípica de compostos envolve a busca da atividade de novas moléculas sobre o parasito, buscando ciclos de otimização de modo a atingir características de eficácia, amplitude de janela terapêutica e propriedades farmacológicas e de drogabilidade satisfatórias. Nesse processo, diversas bibliotecas de moléculas vêm sendo disponibilizadas por indústrias farmacêuticas, ou mesmo por químicos medicinais na academia, aos grupos de quimioterapia experimental para o teste sobre o parasita da doença de Chagas, e também da malária, doença do sono, toxoplasmose, leishmaniose, dentre tantas outras doenças negligenciadas. Assim, uma busca começa em ensaios *in vitro* com milhares de compostos, incluindo os testes utilizando a metodologia do “high throughput screening”. As moléculas selecionadas com base nas suas características de “hit” (incluindo, além dos estudos fenotípicos, os *in silico* visando predição de perfil farmacocinético e das Leis de

Lipinski) passam pelo primeiro filtro, podendo ser otimizadas e mesmo testadas na fase seguinte para identificação de compostos líderes (“lead”), ou seja, substâncias que de fato devem prosseguir na triagem pré-clínica para os ensaios *in vivo*, para prova de conceito (Tabela 2) (Chatelain 2016; Scarim et al. 2018).

Tabela 2 - Critérios e parâmetros de seleção e determinação de compostos “hit” e “lead” para a doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset 2014).

“Hit”		
Critérios	Parâmetros	
Eficácia <i>in vitro</i>	Atividade Seletividade: Regras de Lipinski	EC ₅₀ ≤10 µM sobre amastigotas intracelulares (DTU II e VI). Colocar o que se deseja das regras de Lipinski
DPMK <i>in silico</i>	Alertas estruturais (metabolismo/reatividade/estabilidade)	Priorizar hits, mas não deve ser utilizado como critério definitivo de seleção
Toxicidade <i>in silico</i>	Alertas estruturais	Proceder com cautela, testar o mais cedo possível para determinar a extensão do problema percebido
Perfil químico	Rotas sintéticas favoráveis	Via sintética aceitável para o composto e/ ou análogos (< 8 passos)
“Lead”		
Eficácia <i>in vitro</i>	Atividade	Atividade 10-20 vezes maior do que “hit”
	Seletividade	Maior que o “hit” (ideal ≥ 50 vezes) <i>versus</i> células de mamíferos
Eficácia <i>in vivo</i>		Redução de 80 % da parasitemia ou não detecção de parasitos ao final do tratamento e aumento da sobrevida (10x50 mg/Kg oral)
DPMK* <i>in silico</i>	Regras de Lipinski	Priorizar hits não devendo ser utilizado como critério de seleção definitivo
DPMK <i>in vitro</i>	Estabilidade metabólica (microsomas de fígado murino e humano)	Estabilidade no escalonamento (ranking) do progresso dos compostos como médio ou alto
	Permeabilidade a células Caco-2 ou MDCK Pgp	Escalonamento (ranking) do progresso dos compostos como médio ou alto
	Solubilidade	Valor de pH abaixo 7,4 > 0,01 mg/mL
	Ligação a proteína	Apenas se for detectado problema com biodisponibilidade
	Inibição de CYP3A4	EC ₅₀ > 10µM
DPMK <i>in vivo</i>	Estabilidade no sangue e plasma	Avaliado
	Farmacocinética em camundongo	Exposição do camundongo 10 mg/Kg bid ou 20 mg/Kg dos compostos que atingirem níveis plasmáticos acima do EC ₅₀ nas últimas 24 horas progridem no <i>in vivo</i>
Toxicidade <i>in vitro</i>	Estruturas alerta	Ensaio relevantes (testes de Ames, genotoxicidade, cardiotoxicidade)
Toxicidade <i>in vivo</i>		Não exibir ação tóxica em camundongo com dose única
Perfil químico	Rotas sintéticas favoráveis	Não exibir potenciais dificuldades que impeçam a síntese em escala até 1g + SAR preliminar com o mínimo de 10 compostos: evitar série faltando SAR ou exibindo SAR “flat”
	Relação estrutura-atividade (SAR)	

* “Drug metabolism and pharmacokinetics”: metabolismo de fármaco e farmacocinética

Nesse âmbito, muitas moléculas já foram identificadas e testadas, como os inibidores da tripanotiona redutase (Ilari et al. 2018), as amidinas aromáticas (Santos et al. 2018) e os inibidores da enzima CYP51 (Urbina 2009; Soeiro et al. 2013), estas últimas as mais promissoras que chegaram a ensaios clínicos, mas falharam, sendo elas o posaconazol (Figura 5) e o pró-fármaco do ravuconazole, o composto E1224 (Molina et al. 2014; Morillo et al. 2017; Torrico et al. 2018). Portanto, até o presente momento, não foi descoberto o tratamento que possa representar uma alternativa ao que se tem na clínica há mais de cinco décadas e que exhibe muitas limitações quanto ao uso, como acima discutido.

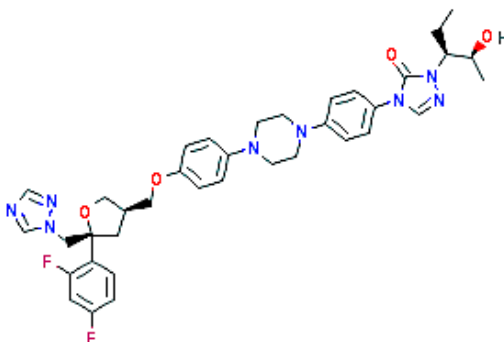


Figura 5 - Estrutura química do posaconazol (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).

Ainda sobre a falha do posaconazol e do E1224, é preciso informar que em humanos não foram capazes de promover cura estéril, e isso levanta questionamentos sobre a aplicabilidade do desenho e busca de novas moléculas inibidoras da enzima CYP51 (Molina et al. 2014; Morillo et al. 2017; Torrico et al. 2018). De acordo com Albajar-Viñas e Dias (2014), é importante não ignorar os resultados e ponderar sobre o que eles nos mostram além de um fracasso terapêutico. Não apenas a atividade de posaconazol é diferente sobre as formas do parasita (amastigota *versus* tripomastigota, com distintas atividades metabólicas e localizações) relevantes à infecção humana, bem como é diversa a natureza genética do parasita. Nesse ponto é preciso salientar que diversos grupos sugerem a presença de amastigotas quiescentes presentes em tecidos, mas que, ainda assim, podem contribuir para a ativação ininterrupta da resposta imune que acaba por danificar o próprio organismo, ou mesmo ser altamente relevante em casos de reativação da doença, recorrente em pacientes que apresentam estados eventuais de imunossupressão (Urbina 2010).

A utilização do posaconazol em estudos pré-clínicos e clínicos da doença de Chagas representa um exemplo do reposicionamento de fármacos, tendo em vista que este medicamento foi desenvolvido para a terapia de infecções fúngicas

sistêmicas (Greer 2007). O reposicionamento de fármacos é uma estratégia que consiste em identificar medicamentos licenciados utilizados para outras doenças parasitárias ou de outras etiologias cujos mecanismos de ação possam ser compartilhados pela etiologia em estudo, no nosso caso, o *T. cruzi* (Ashburn e Thor 2004; Kaiser et al. 2015). Tal abordagem é utilizada frequentemente na busca de novos fármacos para outras enfermidades e caminha lado a lado à possibilidade de combinar medicamentos e assim reduzir efeitos adversos, tempo de estudos e pesquisa, além de custos (Nwaka e Hudson 2006; Coura 2009). Essas metodologias viabilizam a investigação mais rápida e barata de alternativas terapêuticas que podem proporcionar benefícios aos portadores. A pesquisa, desse modo, pula etapas como a determinação de dose máxima tolerada e perfil de toxicidade, tanto em células mamíferas quanto em animais, contribuindo inclusive para o princípio dos 3R, que se propõe a reduzir, refinar e substituir o uso de animais, ou de seus produtos na ciência (Cha et al. 2017). Além disso, as estratégias de reposicionamento e combinação direcionam medicamentos comercialmente disponíveis em voga, ou mesmo esquecidos, para a utilização sob nova perspectiva. A indústria, entretanto, demanda incansáveis burocracias para aceitar sua nova aplicabilidade para uma doença de pobreza, como as doenças negligenciadas o são. Mesmo assim, isto representa um incremento nos lucros de uma companhia e um reingresso mais acelerado no mercado, em comparação ao que aconteceria para uma nova molécula que deve passar por todos os testes pré-clínicos e clínicos inerentes ao processo de quimioterapia experimental e produção industrial (Ashburn & Thor 2004).

O nifurtimox é um exemplo de reposicionamento e combinação, não para a doença de Chagas, mas para a doença do sono, ou tripanossomíase africana, causada pelo *T. brucei* (Schmid et al. 2012; Alirol et al. 2013). O medicamento, anteriormente utilizado com restrições para a doença de Chagas, foi testado e aprovado para o uso em associação com a eflornitina, levando à produção da formulação NECT para o tratamento do segundo estágio da tripanossomíase africana. Isso foi um progresso para os portadores, alcançando resultados clínicos muito positivos em relação à terapia usada no momento (Schmid et al. 2012; Alirol et al. 2013) e, assim, estimulou a continuidade dos estudos de reposicionamento e combinação para a doença de Chagas.

O efeito sobre agentes infecciosos advindos do reposicionamento em associação à combinação de fármacos, permite redução das doses administradas, ou mesmo do custo e tempo de administração do medicamento, visando posologia

sempre menos tóxica e mais adequada ao paciente do que o benznidazol, de forma a encorajar a aceitação e adesão a um novo esquema de tratamento (Coura 2009). Conjuntamente, busca-se, com essas estratégias, obter diferentes mecanismos de ação que atinjam o parasita em múltiplos pontos ao mesmo tempo, seja pela inibição de enzimas em vias metabólicas, ou seja pela ativação de vias de autodestruição. Assim, ao contemplar diversos alvos no parasita, é possível contornar mecanismos de resistência já estabelecidos, e até mesmo reduzir a probabilidade de que esta se instaure (Menna-Barreto & de Castro 2017).

Considerando ainda que as doenças negligenciadas como a doença de Chagas recebem baixo aporte financeiro, é crucial realçar que a pesquisa em reposicionamento e combinação de fármacos é um investimento de baixo custo que representa baixo risco ao capital de uma empresa, ou mesmo de um grupo de pesquisa, e, ao mesmo tempo, reflete em expressivo retorno (Ashburn & Thor 2004; Cha et al 2017). Além de gerar conhecimento relevante para a enfermidade alvo, igualmente o produz de modo aproveitável para outras doenças, e ainda pode ser direcionado para o estudo de vacinas, controle e profilaxia. Da parte financeira, indústrias farmacêuticas podem apenas almejar novos horizontes lucrativos, ainda que sejam solicitadas a comercializar seus medicamentos já rendáveis a valores pífios em relação ao seu volumoso orçamento, pois mesmo que os portadores sejam pobres, são inúmeros e, infelizmente, ainda crescentes (Ashburn & Thor 2004; Cha et al 2017).

No presente trabalho, três medicamentos e uma molécula sintética obtida a partir de uma fonte botânica, foram escolhidos a partir de informações obtidas na literatura para serem avaliados pelas metodologias das abordagens acima descritas.

1.2.5.1 Metronidazol

O metronidazole (Figura 6) é um derivado nitroimidazólico com ampla atividade antibacteriana (Roe 1977) e comprovada eficácia contra protozoários unicelulares, sendo atualmente utilizado no tratamento contra giardíase (Einarsson, Ma'aveh e Svärd 2016) e tricomoniase (Menezes, Frasson & Tasca 2016). Em 1983, Agosin demonstrou que epimastigotas de *T. cruzi* podem captar e metabolizar metronidazol, provocando modificações ultraestruturais na morfologia dos parasitas tratados, como alteração do perfil do retículo endoplasmático, e danos na membrana mitocondrial (Paulin et al. 1983). Mais tarde, estudos preliminares reportaram o uso de metronidazol em portadores da doença de Chagas, porém os resultados foram de fato

inconclusivos (Levi & Neto 1970; Blandón et al. 1993), impedindo a continuidade dos estudos com o fármaco.

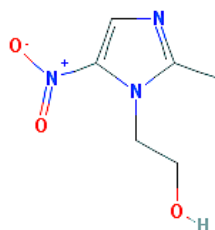


Figura 6 - Estrutura química do metronidazol (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).

1.2.5.2 Levamisol

O levamisol (Figura 7) é um tiazol sintético, originalmente utilizado como medicamento anti-helmíntico (Lionel et al. 1969; Scherb 1969). Há algumas décadas, os cientistas vêm mostrando sua aplicabilidade como agente imunomodulador cujos efeitos podem variar de maléficos a benéficos, dependendo essencialmente da posologia, do tempo do tratamento (duração e administração corretamente nas horas determinadas), e do estado imune do hospedeiro (Brunner & Muscoplat 1980). Recentemente, levamisol foi também testado como terapia adjuvante para doenças infecciosas, *in vitro* e *in vivo*, tal como em ensaios clínicos, novamente apresentando resultados opostos totalmente relacionados ao esquema terapêutico e à condição imunológica do hospedeiro. O emprego de agentes imunomoduladores, como levamisol, é investigado como alternativa de tratamento para doenças infecciosas em uma tentativa de contornar os mecanismos de defesa e resistência desenvolvidos pelos patógenos, visando induzir o sistema imune do portador do parasito a melhorar suas estratégias de proteção para combater mais adequadamente a ameaça (Butler 1982; Rezai et al. 1988; Maude et al. 2014; Köksal et al. 2016).

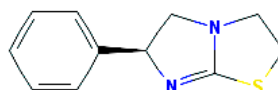


Figura 7 - Estrutura química do levamisol (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).

1.2.5.3 Imatinib

O imatinib (Figura 8) foi introduzido em 2001 pela Novartis sob o nome de Gleevec® ou Glivec® (Manley et al. 2002). Este medicamento concebido racionalmente como um inibidor seletivo da tirosina cinase BCR-ABL e é amplamente utilizado contra neoplasias, como a leucemia mielóide crônica e o tumor estromal gastrointestinal (Rix et al. 2007; Cruz-Rico et al. 2013). Logo após a expiração da patente em 2016, outros medicamentos *me-too* já estavam disponíveis no mercado (fármacos com a mesma atividade e estrutura química muito semelhante, com pequenas diferenças), evidenciando a alta capacidade da indústria farmacêutica de liderar a área de quimioterapia experimental (Musumeci et al. 2015). Desde então, análogos e derivados de imatinib vêm sendo sintetizados e testados, não apenas para diferentes neoplasias, como também para enfermidades infecciosas tropicais, como malária (Pathak, Colah & Ghosh 2015), doença do sono (Behera, Thomas & Mensa-Wilmot 2014), leishmaniose (Wetzel, McMahon-Pratt & Koleske 2012), esquistossomose (Beckmann et al. 2014; Buro et al. 2014) e filariose (O'Connell et al. 2015).

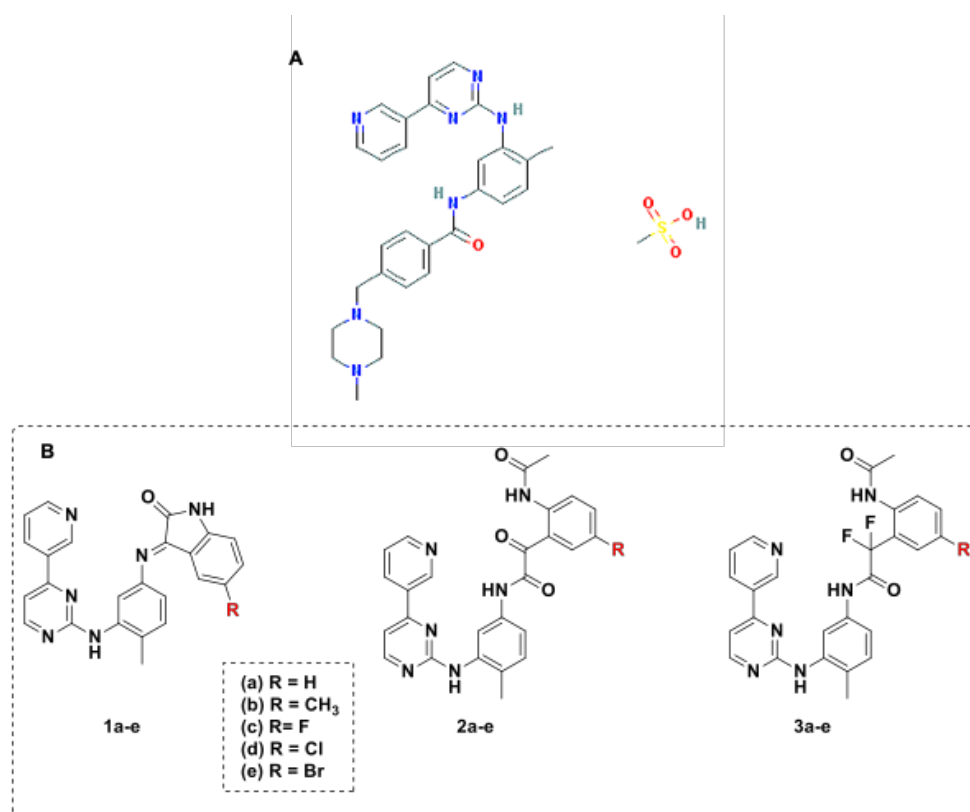


Figura 8 - Estruturas químicas do mesilato de imatinib (A) (fonte: PubChem – Open Chemistry Database) e derivados (B) produzidos no Laboratório de Síntese de Fármacos (Farmanguinhos/ Fiocruz).

1.2.5.4 Cloridrato de tomatidina

Produtos naturais são infinitas fontes de novas moléculas que têm sido cada vez mais exploradas pela química medicinal (Newman & Cragg 2007). Animais e plantas fornecem aos cientistas inúmeros compostos biologicamente ativos, sendo as solanáceas uma família de vegetais que oferece uma grande diversidade de substâncias funcionais já identificadas, ou sob investigação para a determinação de suas propriedades (Friedman 2015). Um exemplo dessa família é o tomate que possui, dentre tantas moléculas, glicosídeos cujas atividades antioxidante, anticarcinogênica e antimicrobiana têm sido descritas e difundidas (Friedman 2013). O licopeno e a tomatina são algumas destas substâncias, sendo importante comentar que sua concentração nos frutos varia de acordo com a maturação, influenciando nas quantidades obtidas na extração (Friedman 2013).

Ainda que a síntese orgânica de moléculas naturais seja complexa, um certo número delas já pode ser obtida de indústrias químicas, como por exemplo a tomatidina, uma aglicona da tomatina disponibilizada sob a forma de cloridrato de tomatidina (TH, do inglês *tomatidine hydrochloride*) (Figura 9). Este composto vem sendo cada vez mais investigado, tendo já demonstrada diversas atividades biológicas, por exemplo, no uso concomitante a antibióticos aminoglicosídeos *in vitro*, induzindo maior redução da colônia de *Staphylococcus aureus* e outras bactérias de isolados clínicos (Mitchell et al. 2011, 2012; Soltani et al. 2017). Também se demonstrou eficaz na inibição do crescimento de *Phytomonas serpens*, um protozoário tripanossomatídeo parasita de tomates (Medina et al. 2015), e do mesmo modo no crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis* em ensaios *in vitro* (Medina et al. 2012). Em todos estes exemplos, a atividade de TH foi obtida em concentrações micromolares muito baixas e ausência de efeitos citotóxicos significativos.

A inibição do crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* já foi inclusive previamente demonstrada em comparação ao uso de cetoconazol, sugerindo uma possível atividade sobre lipídios de membrana, denotada pela observação da alteração morfológica produzida nos parasitas após cultivo (Chataing et al. 1998). Enquanto isso, outros autores indicam a TH como possível molécula base para o estudo de novos compostos seletivamente ativos contra a enzima tripanotona redutase, essencial para o metabolismo de tripanossomatídeos como o *T. cruzi* (Argüelle, Cordell & Maruenda 2016).

Além disso, ensaios *in vivo* já foram realizados com sua aplicação em complemento à dieta de camundongos, normais e gestantes, demonstrando nenhum grau de toxicidade aos animais (Friedman, Henika & Mackey 2003). A TH foi ainda administrada para a investigação de seu potencial em reduzir a produção de ésteres de colesterol, no que reside a indicação de seu mecanismo de ação como inibidor de enzimas da via de síntese de colesterol (Fujiwara et al. 2012). No mesmo estudo propôs-se que TH possui atividade cardioprotetora, ademais sugeriu-se uma possível atividade imunomoduladora relacionada à inibição de NK-kB e a via da JNK, havendo redução da formação de placas de ateroma (Chiu & Lin 2008).

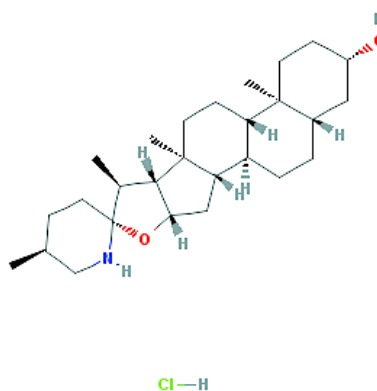


Figura 9 - Estrutura química do cloridrato de tomatidina (fonte: PubChem – Open Chemistry Database).

1.3 O impacto de comorbidades na doença de Chagas: estabelecendo o modelo de coinfeção com *Schistosoma mansoni*

Além da busca de alternativas terapêuticas, é preciso estar atento para os demais aspectos que envolvem uma infecção, como mencionado acima. Questões inerentes ao hospedeiro, ao parasita e ao ambiente devem ser consideradas e deve-se determinar até que ponto influenciam o curso da doença e seu impacto no tratamento dela. Estes aspectos não são analisados de uma maneira geral, uma vez que demandam estudos de alta complexidade epidemiológica e um grande número de profissionais especializados em controle, profilaxia, manejo de pacientes, tratamento etiológico e diagnóstico (Elliott & Yazdanbakhsh 2012).

Em condições de laboratório, não é possível analisar questões ambientais, mas pode-se tentar elucidar e responder perguntas relacionadas à influência de outros medicamentos sobre o tratamento convencional e de referência de uma doença, como

por exemplo os estudos aqui apresentados sobre combinação de fármacos, bem como perguntas relacionadas à ocorrência de comorbidades, a partir do desenvolvimento de modelos de coinfeção com outros agentes patogênicos, buscando reproduzir situações recorrentes no cenário epidemiológico humano.

Para esse propósito, foi utilizada a infecção experimental por *S. mansoni*. A doença de Chagas e a esquistossomose mansônica não são registradas juntas de modo frequente, mas com os mapas de prevalência no território brasileiro é possível sobrepor ambas e perceber que podem ser um cenário real. Contudo, a proposta também foi executar um modelo helmíntico controlado que geraria dois modelos: o de infecção aguda e crônica, permitindo assim explorar o quanto a presença de outra parasitose influenciaria no curso da doença de Chagas e qual seu potencial impacto no desfecho do tratamento com benznidazol.

Este modelo já foi utilizado anteriormente por Rodrigues et al. (2017). Entretanto, seu propósito foi utilizar a infecção por *S. mansoni* para investigar a modulação da expressão de arginase-1/iNOS em coração e fígado de animais infectados por *T. cruzi*, tendo em vista as alterações fisiológicas bem caracterizadas causadas no modelo murino de infecção pelo helminto. Aqui apresentaremos um modelo distinto que tem como foco descrever aspectos parasitológicos, imunológicos e clínicos no curso da infecção experimental por *T. cruzi* e sua possível influência no desfecho do sucesso terapêutico induzido por Bz. Para isso, é fundamental conhecer sobre o segundo agente etiológico que está no panorama do trabalho, bem como compreender pormenores da doença causada por ele, sinalizando sua importância para o modelo.

1.4 Esquistossomose

1.4.1 Epidemiologia

A esquistossomose é uma parasitose negligenciada endêmica em 54 países tropicais (WHO 2016). É causada por cinco espécies diferentes de um helminto do gênero *Schistosoma* que podem levar à doença urinária ou intestinal. A doença é de veiculação hídrica, sendo, portanto, a falta de saneamento básico um aspecto fundamental para sua prevalência em áreas pobres, associada à aspectos culturais de uma população (WHO 2002).

No Brasil, a esquistossomose mansônica, causada pelo *S. mansoni*, acomete em torno de três milhões de indivíduos, segundo estimativas do Ministério da Saúde em 2014 (Figura 10). Entretanto, ainda que seja uma doença de notificação compulsória, seu diagnóstico muitas vezes não é realizado pela falta de acesso aos serviços públicos de saúde, por falta do conhecimento do profissional responsável, e mesmo pela baixa compreensão da enfermidade pela população de uma área endêmica. Scholte et al. (2014) demonstraram em seu modelo bayesiano a distribuição dos casos de infecção por *S. mansoni* no território brasileiro (Figura 10). Assim, pode-se inferir que as áreas acometidas no país são muito mais extensas e exigem maior atenção e cuidado das intendências de saúde.

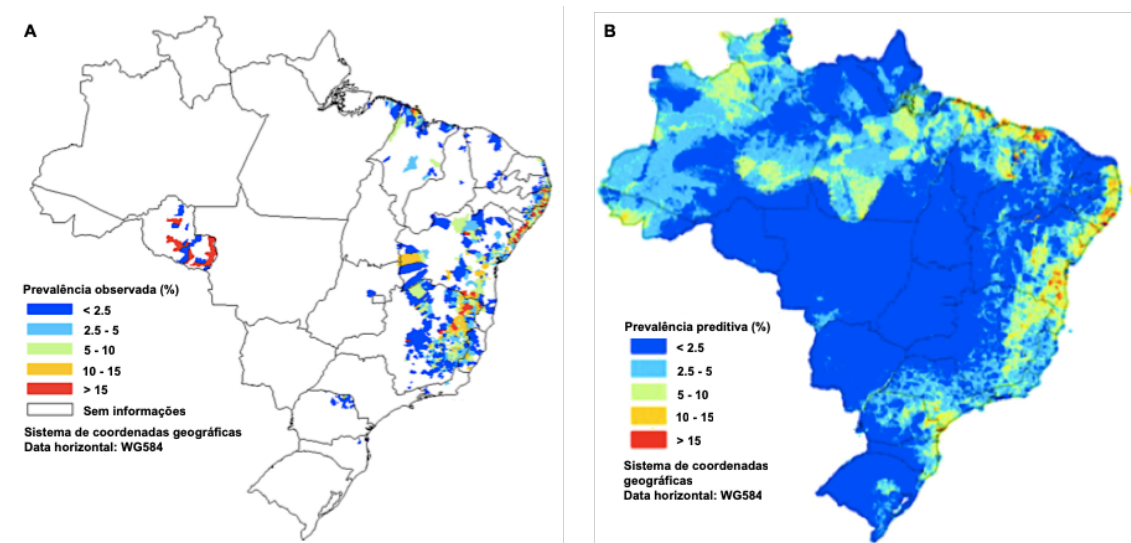


Figura 10 - (A) Prevalência da esquistossomose observada no Brasil entre 2005 e 2009 (dados do Programa de Controle da Esquistossomose - PCE, Ministério da Saúde); (B) estimativa da distribuição espacial da prevalência da infecção por *Schistosoma mansoni* (adaptado de Scholte et al. 2014).

1.4.2 Parasitologia

O *S. mansoni* é um trematódeo digenético de ciclo complexo (Figura 11) (Basch 1990). Um hospedeiro mamífero contaminado, no caso, o homem, elimina suas fezes contendo ovos viáveis do parasita em coleções hídricas que abrigam caramujos do gênero *Biomphalaria*. Os miracídios (formas unicelulares) presentes nos ovos eclodem em adequadas condições de temperatura e luminosidade, e buscam ativamente o hospedeiro invertebrado cujos tecidos serão o ambiente para a reprodução assexuada do helminto (Haberl et al. 1995). Os miracídios se transformam em esporocistos que se desenvolvem para as formas pluricelulares, as cercárias. É importante comentar que ainda que não cause infecção no caramujo, o *S. mansoni*

causa-lhe danos irreversíveis (Yoshino, Boyle & Humphries 2001). Quando as cercárias atingem a maturidade biológica, igualmente em adequadas condições de temperatura e luminosidade, deixam os moluscos a procura de hospedeiros vertebrados para continuar seu ciclo de vida (Rey 2001).

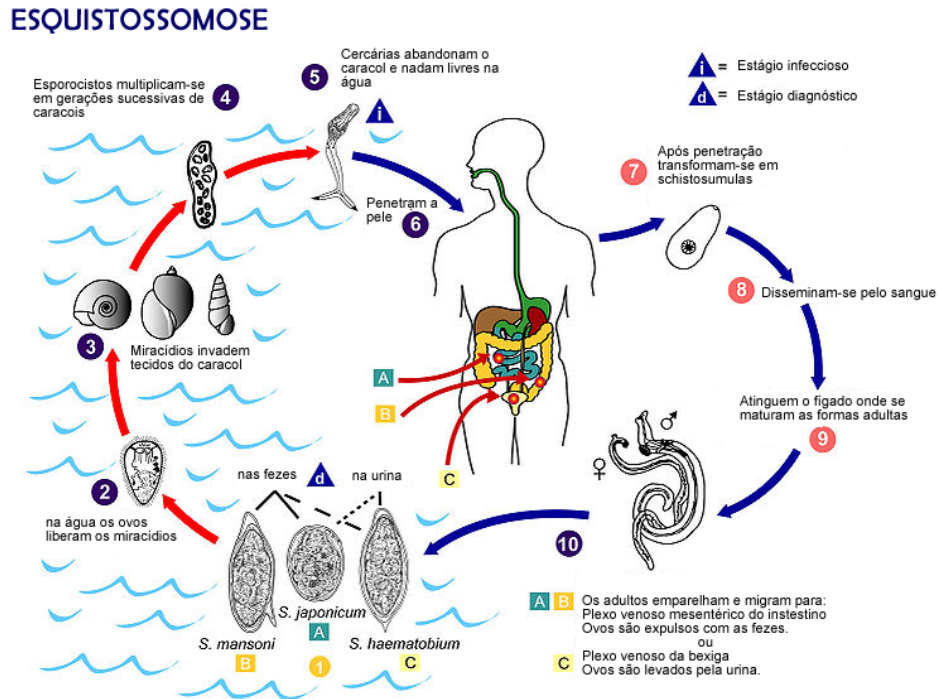


Figura 11 - Esquema ilustrativo do ciclo de *Schistosoma mansoni*. (adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention 2012).

Atraídas por estímulos quimiotáticos, as cercárias nadam agilmente até encontrar o mamífero. Sua motilidade demanda muita energia e velocidade, o que faz com que seu desempenho seja restringido a duas ou três horas de natação intensa. Após este tempo, sua viabilidade é extremamente reduzida e logo morrem (Cunha 1970; Whitfield et al. 2003). As cercárias bem-sucedidas que localizaram o homem, penetram ativamente pela sua pele, perdendo sua cauda no processo. Ao atravessar os tecidos, até atingir a corrente sanguínea, transformam-se em esquistossômulos que serão conduzidos passivamente pelo sangue por todas as partes do corpo, diferenciando-se em vermes adultos durante seu deslocamento, e causando danos ao organismo do homem (He, Chen & Ramaswamy 2002). Num dado momento que ainda não se sabe definir a razão, os vermes adultos se estabelecem no sistema de veias porta-hepático (Barbosa et al. 1978) e se acasalam, a fêmea sendo abrigada no interior do canal ginecóforo do macho e assim permanecendo (Tchuem Tchuente et al. 1996). A seguir da cópula, o casal de vermes se direciona para as veias mesentéricas para realizar a oviposição em que a fêmea pode liberar, por dia, cerca

de 150 a 300 ovos contendo miracídios (Clegg 1965). Estes podem, basicamente, (a) atingir a corrente sanguínea e ser levados em refluxo para o fígado, ou chegar a qualquer outro órgão, estabelecendo-se aí e induzindo a formação de granulomas esquistossomóticos; e (b) alcançar a luz intestinal e ser levados para o ambiente externo pelas fezes do hospedeiro.

1.4.3 Aspectos gerais clínicos, imunológicos e acesso ao diagnóstico

A primeira evidência da infecção por *S. mansoni* que pode ocorrer é a dermatite cercariana devido a penetração ativa das cercárias na pele do hospedeiro, acompanhada de prurido, eritema, edema e pápulas que podem permanecer por até cinco dias (Prata 1978). Durante as próximas duas a oito semanas do contato e entrada do parasita no hospedeiro, aproximadamente o tempo em que o esquistossômulo circula pelo organismo e se estabelece como verme adulto no espaço porta-hepático, o paciente pode apresentar um quadro de febre, anorexia, diarreia, dores abdominais, e ao exame clínico será notada uma discreta hepatomegalia (Neves 1965). Esses sintomas são relacionados à passagem do parasita pelo organismo, e pode haver inclusive perturbações cardíacas, assim como sintomas respiratórios transientes associados a uma pneumonia eosinofílica (síndrome de Löffler) (Neves 1965). A eosinofilia periférica pode ser, portanto, observada no exame hematológico solicitado pelo profissional de saúde, e assim viabilizar o diagnóstico da esquistossomose ainda na fase aguda, estando obviamente associada ao histórico epidemiológico do indivíduo que é fundamental para a determinação da doença nesse momento (Neves 1965). O quadro clínico apresentado pelos pacientes na fase aguda se assemelha à diversas outras doenças, sobretudo infecciosas e helmínticas, tal como foi comentado anteriormente para a doença de Chagas.

Nesse ínterim, constitui-se uma resposta imune do tipo Th2, com predominância de citocinas IL-4 e IL-5, bem como células granulocíticas de defesa (mastócitos, eosinófilos e basófilos) (Pearce & MacDonald 2002). A resposta imune específica do organismo contra o parasita é estruturada, mas na maioria dos casos não é suficientemente eficaz para combater esquistossômulos e, sobretudo, os vermes adultos que possuem camadas de tecidos altamente resistentes ao ataque bioquímico do hospedeiro, capazes inclusive de mimetizar moléculas dele visando escape da resposta imunológica (Pearce & MacDonald 2002).

Entre três e cinco semanas do início da infecção, o desbalanço entre sistema imune e helminto conduz o homem à fase crônica da ESQ (Pearce & MacDonald 2002). Contudo, há indivíduos que vivem em áreas endêmicas e estão constantemente expostos aos antígenos do parasita, e assim estabelecem uma relação diferente e, de certa forma equilibrada, do ponto de vista imunológico, com o helminto, podendo não apresentar os sinais e sintomas da doença, ou mesmo ser portadores assintomáticos, eliminando ovos ao longo de toda sua vida (Prata 1995). Esses são a maioria dos casos de esquistossomose, e considerando ainda que se encontram em regiões de pobreza e poucos serviços de saúde, permanecem sem diagnóstico e contribuem para a baixa casuística registrada pelo Ministério da Saúde, de acordo com o comentário no item 4.1 (Prata 1995).

Aqueles que se tornam sintomáticos podem apresentar essencialmente quadro hepatointestinal ou hepatoesplênico, ou mesmo a esquistossomose panvisceral (WHO 1997). O quadro clínico está essencialmente relacionado à presença do ovo no tecido, gerando reações imunológicas intensas denominadas granulomas esquistossomóticos (Pearce & MacDonald 2002). Como exposto anteriormente, uma vez que o ovo pode atingir a circulação sanguínea e alcançar qualquer órgão do hospedeiro, é comum observar a presença dos granulomas em pulmão, coração, pâncreas, rins, e até no sistema nervoso, causando quadros clínicos distintos relacionados a cada um cuja intensidade depende da quantidade de ovos no local, mas também de fatores intrínsecos ao hospedeiro (Conceição, Lenzi & Coura 2008). Todavia, o fígado é um órgão de destaque na infecção por dois aspectos essenciais: é um órgão imunotolerante, já que é exposto regularmente a diversos antígenos do helminto e microbianos trazidos pelo parasita do intestino, além de ser um grande compartimento neuroendócrino, integrando os sistemas do corpo e a resposta sistêmica ao patógeno (Crispe et al. 2006).

Em relação aos granulomas esquistossomóticos, Lenzi e colaboradores (1998) descrevem sua formação como uma tentativa de simbiose entre os organismos. Reis e Andrade (1987) explanam que o sistema imune tenta envolver o corpo estranho que é o ovo, bem como isolar as toxinas produzidas pelo miracídio que nele se encontra, e assim evitar que ocorram perturbações fisiológicas. Assim, institui-se uma resposta essencialmente Th1 com perfil inflamatório que não visa prejudicar o hospedeiro, mas sim defendê-lo. Há intenso e prolífico infiltrado inflamatório mononuclear na região periovular que ao longo do tempo vai dando lugar a fibras elásticas e tecido conjuntivo, criando desta forma uma organização multicelular em diversas camadas que inclusive

indicam o tempo que o granuloma se estabeleceu no local (Metwali et al. 1996). Além disso, uma resposta Th2 é necessária para o completo desenvolvimento do granuloma e da fibrose associada aos ovos (Kaplan et al. 1998). O miracídio vive em torno de 21 dias, restando a seguir apenas a estrutura que o circunda, primordialmente desenvolvida para sua resistência no ambiente externo. Ao redor dos restos, a dinâmica arquitetura granulomatosa que vai do amadurecimento à involução (Prata 1957; Lenzi et al. 1998).

No que tange o diagnóstico da esquistossomose, além do histórico epidemiológico e análise clínica do paciente, pode ser realizada investigação sorológica, ainda que não específica, pois associada às informações anteriores permite avaliar o estado imune do indivíduo. Não obstante, é de suma importância a realização do exame parasitológico que investiga a presença de ovos nas fezes do portador (Rouquayrol e Almeida-Filho 2003). Existem diversos métodos, sendo o Kato-Katz o mais indicado, uma vez que permite uma análise quantitativa de ovos por grama de fezes e, assim, determinar a intensidade da infecção. Este método é aplicado em inquéritos epidemiológicos, por ser de rápida e fácil execução, e de baixo custo (Katz, Chaves & Pellegrino 1972). É imprescindível ainda relatar que indivíduos tratados (vermes adultos eliminados) ainda expelirão ovos por, em média, até 20 anos após o diagnóstico de cura, dado que os ovos são depositados pelos helmintos nas veias mesentéricas e podem a qualquer momento da vida do portador atingir a luz intestinal, sendo assim o exame de fezes não deve ser o único determinante na avaliação de casos isolados ou mesmo em uma população. Da mesma forma, esses ovos podem atingir a circulação sanguínea tardiamente em relação ao momento da sua deposição, levando igualmente à formação dos granulomas descritos acima (Dias 1949).

1.4.4 Tratamento e controle

O manejo da esquistossomose associa tratamento de portadores (abordagem terapêutica e clínica, disponibilidade e acesso aos serviços de saúde públicos), controle químico ou biológico do hospedeiro invertebrado, educação da população (intervenções socioculturais) e saneamento básico (tratamento e distribuição de água de boa qualidade, melhorias na infraestrutura domiciliar e municipal) (McManus et al. 2018). As medidas adotadas são muito semelhantes entre os países, de uma maneira geral, diferindo essencialmente na questão da administração de medicamentos em massa empregados na maioria dos países africanos, mas não no Brasil. Todas as

abordagens são recomendadas aos países endêmicos pela OMS, e são atualizadas de tempos em tempos, desde seu início na década de 60, por especialistas de várias nacionalidades, incluindo brasileiros (WHO 2002).

Atualmente, o tratamento de primeira escolha da esquistossomose é realizado com praziquantel que, desde a patente expirada, é sintetizado por iniciativas públicas em três países, dentre eles o Brasil, por Farmanguinhos/Fiocruz (Da Silva et al. 2017). Como segunda alternativa terapêutica existe a oxamniquina que, por sua vez, tem elevado custo comercial, bem como pode apresentar efeitos neurotóxicos, apesar de sua eficácia terapêutica comparável à primeira escolha (Da Silva et al. 2017). O praziquantel é utilizado não somente contra *Schistosoma*, mas também contra outros trematódeos (ex. *Clonorchis sinensis*) e cestódeos (ex. *Taenia sp.*) (Dayan et al. 2003). Para a esquistossomose, é administrado em dose única e causa poucos efeitos colaterais, sendo 90-100 % eficaz na fase aguda, e 70-80 % nos casos crônicos tardios e mais complicados (Vale et al. 2017). É também indicado para as administrações terapêuticas em massa existentes em países africanos, como acima mencionado, mas atualmente há a busca por novos fármacos ou combinações terapêuticas com o praziquantel que possam sobrepor cepas resistentes dos *Schistosoma* (McManus et al. 2018). Há também investigações para o desenvolvimento de uma formulação pediátrica, uma vez que o tratamento de crianças é visto como fundamental para o controle da doença e para a preservação do desenvolvimento infantil nas áreas endêmicas (Vale et al. 2017).

1.5 Justificativa

A partir do exposto, compreende-se a urgência da necessidade de novas alternativas terapêuticas para a DC que sejam mais seletivas e apresentem melhor eficácia e segurança para o portador. Nesse âmbito, o reposicionamento de fármacos já licenciados representa uma abordagem que reduz os custos e o tempo de disponibilidade comercial dos medicamentos: uma vez que os estudos farmacológicos pré-clínicos já estão descritos, a atenção volta-se para os ensaios clínicos para a “nova” doença alvo; Ademais, um medicamento bem estabelecido no mercado tem um maior alcance de indivíduos, podendo suprir a falta de distribuição da alternativa terapêutica inicial em determinada região. Da mesma maneira, o uso de terapia combinada há anos já é empregado em diversas doenças, infecciosas ou não, e pode viabilizar melhoria da estratégia terapêutica do ponto de vista biológico, ao sobrepor

mecanismos de resistência do parasita, e clínico, ao disponibilizar tratamentos de menores doses e curtos períodos de administração, facilitando a adesão dos pacientes. Além disso, é fundamental investigar o impacto de comorbidades incluindo as helmínticas sobre o curso e tratamento da infecção por *T. cruzi*, pois mesmo que casos não sejam notificados, pode-se inferir que ocorrem e carecem de atenção por parte dos profissionais de saúde, principalmente dos gestores que determinam o bem-estar social.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Buscar alternativas terapêuticas para a fase aguda da doença de Chagas com abordagens de reposicionamento de medicamentos e triagem fenotípica de novos candidatos a fármacos, em esquemas de coadministração. Paralelamente, objetivamos avaliar o impacto de uma coinfeção helmíntica sobre o curso da infecção experimental aguda por *Trypanosoma cruzi* e seu desfecho terapêutico com o uso do benznidazol.

2.2 Objetivos Específicos

- a. Investigar, em modelos de infecção aguda por *T. cruzi* (*in vitro* e *in vivo*), a eficácia terapêutica do reposicionamento de metronidazol, levamisol e imatinib (e derivados) em esquemas de monoterapia e em coadministração com benznidazol;
- b. Avaliar em ensaios fenotípicos, *in vitro* e *in vivo*, a ação de inibidores da rota sintética de esteróis e do cloridrato de tomatidina sobre *T. cruzi* em esquemas de monoterapia e em coadministração com benznidazol;
- c. Estabelecer e descrever o modelo de comorbidade doença de Chagas/esquistossomose, com infecção aguda por *T. cruzi* sobre infecções aguda e crônica de *Schistosoma mansoni*, sob aspectos parasitológicos, histopatológicos e imunológicos;
- d. Investigar o impacto da comorbidade helmíntica sobre o curso e tratamento etiológico com benznidazol de modelo murino de infecção experimental aguda por *T. cruzi*.

3 ARTIGOS

O cumprimento dos objetivos da presente tese originou cinco artigos, sendo um publicado, dois submetidos e dois em fase final de revisão dos colaboradores para submissão. Os trabalhos encontram-se dispostos a seguir em seções intituladas com o nome original em inglês, respectivamente traduzidos em cada folha de rosto que os introduz. Os artigos substituem as seções **Materiais e Métodos** e **Resultados**.

3.1 Artigo 1 (publicado)

“Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *in vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy”

3.2 Artigo 2 (aceito para publicação)

“Repurposing strategies for Chagas disease therapy: the effect of imatinib and derivatives against *Trypanosoma cruzi*”

3.3 Artigo 3 (aceito para publicação)

“Impact of levamisole in co-administration with benznidazole on experimental Chagas disease”

3.4 Artigo 4 (a ser submetido)

“Phenotypic Screening of lipid biosynthesis inhibitors against *Trypanosoma cruzi*, and the administration of the combo tomatidine with posaconazole *in vitro* and *in vivo*”

3.5 Artigo 5 (a ser submetido)

“The impact of experimental helminthic comorbidity with *Schistosoma mansoni* on the course and treatment of murine *Trypanosoma cruzi* acute infection”

3.1 Artigo 1 (publicado)

“Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *in vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy”

Estratégia de reposicionamento de fármaco contra *Trypanosoma cruzi*: avaliação da atividade de metronidazol em monoterapia e combinação

Metronidazol é um medicamento antimicrobiano de amplo espectro utilizado para o tratamento de giardíase e tricomoníase. Aqui foi avaliada sua possível atividade antiparasitária em doença de Chagas aguda experimental, mediante sua administração sozinho ou associado ao Bz.



Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *In vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy



M.R. Simões-Silva^a, J.S. De Araújo^a, G.M. Oliveira^a, K.C. Demarque^a, R.B. Peres^a, I. D'Almeida-Melo^a, D.G.J. Batista^a, C.F. Da Silva^a, C. Cardoso-Santos^a, P.B. Da Silva^a, M.M. Batista^a, M.T. Bahia^b, M.N.C. Soeiro^{a,*}

^aLaboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Medicina de Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2017

Accepted 31 August 2017

Available online 7 September 2017

Keywords:

Trypanosoma cruzi

Metronidazole

Drug repurposing

Combined therapy

ABSTRACT

Metronidazole (Mtz) is a commercial broad-spectrum nitroimidazole derivative with relevant antimicrobial activity and relative safety profile. Therefore, it is fair to consider Mtz a candidate for drug repurposing for other neglected conditions such as Chagas disease (CD), a parasitic pathology caused by *Trypanosoma cruzi*. CD is treated only with benznidazole (Bz) and nifurtimox, both introduced in clinics decades ago despite important limitations, including low efficacy on the later disease stage (chronic form) and severe side effects. New cheap and fast alternative treatments for CD are needed, thus the repurposing of Mtz was assessed *in vitro* and *in vivo* in mono- and combined therapy. *In vitro* assays demonstrated $EC_{50} > 200 \mu\text{M}$ for Mtz, while for Bz the values ranged from $2.51 \mu\text{M}$ (intracellular forms) to $11.5 \mu\text{M}$ (bloodstream trypomastigotes). When both drugs were combined in fixed-ratio proportions, Mtz promoted Bz potency (lower EC_{50} values). *In vivo* toxicity assays for Mtz in mice showed no adverse effects neither histopathological alterations up to 2000 mg/kg. Regarding experimental *T. cruzi* infection, Bz 100 mg/kg suppressed parasitemia while Mtz (up to 1000 mg/kg) in monotherapy did not, but prolonged animal survival at 250 and 500 regimen doses. The combination of both drugs (Bz 10+Mtz 250) prevented mortality (70%) besides protected against electric cardiac alterations triggered by the parasite infection. Although not able to reduce parasite load, the combination therapy prevented animal mortality; this was possibly due to a protection of the electric cardiac physiology that is normally altered in experimental infection of *T. cruzi*. It also suggested that the interaction with Mtz could have improved the pharmacokinetics of Bz. Our study emphasizes the importance of drug repurposing and combined therapy for CD to contribute to alternative therapies for this neglected and silent pathology.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

As shown by paleoparasitologists in Andean mummies, the parasite *Trypanosoma cruzi* that causes Chagas disease (CD) is present in the American continent for at least 9000 years [1,2]. In 1909, the Brazilian researcher Carlos Chagas reported for the first time not only this severe pathology, but also the presence of the flagellated protozoan in vertebrates (small mammals and human blood samples) and invertebrates (triatomine insects) [3]. After the infection, most patients develop a benign oligosymptomatic acute phase that may bring about flu-like symptoms, which disappear after a few

weeks. Then, due to a competent immune host immune response, the parasitism is controlled (although not eliminated) leading to the later stage called chronic phase [4,5]. This stage remains undetermined for decades in most of the cases, but around 30–40% of the infected individuals develop cardiac and/or digestive syndromes, resulting in high morbidity rates and a negative financial impact on the health care system's budget of endemic countries, sustaining poverty [6,47].

CD affects more than six million people worldwide [8] and there are more or less 25 million others living under the risk of infection [8]. It is notably a vector-borne disease in the 21 endemic Latin American countries; nevertheless, due to development of public policies and integrative initiatives, the domiciliary and blood bank transmission are under control [7,6]. Nowadays, in several areas,

* Corresponding author at: Av. Brasil, 4365 Mangueiras, Rio de Janeiro, Brazil.
E-mail address: soeiro@ioc.fiocruz.br (M.N.C. Soeiro).

such as in Brazil, oral contamination represents the most frequent way of transmission. In contrast, the growing number of new cases in some European and Australasian countries is due to infected blood transfusion or organ transplantation related to the intense migratory flux out of endemic region [9–12].

Regarding the CD therapy, only two drugs are available, benznidazole (Bz) (Fig. 1) and nifurtimox (Nf), both introduced in clinics more than five decades ago. These are not effective on the later chronic phase of the disease, cause severe side effects and some *T. cruzi* strains are naturally resistant to nitroderivative drugs [13]. In this sense, many efforts have been put on the screening of new antichagasic chemotherapeutics through the use of different approaches and directed to distinct parasite metabolic targets such as inhibitors of CYP51, cysteine proteases, kinases, among others [14]. The Target Product Profile (TPP) for CD include many features as those reported by Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi), to guide the drug screening and help scientists in finding the most suitable choice [15]. With the various approaches for anti-parasitic drug discovery, medicine repurposing has been more and more encouraged for CD [14]. When the repurposing is successful, it can shorten in several years the time taken for the production and test of new molecules, yet representing a profitable situation for pharmaceutical companies, once they will attain a new market [13]. The following antifungal E1224 (prodrug of ravuconazole) and posaconazole were evaluated for CD in this context; unfortunately, the outcome showed higher rates of therapeutic failure (70 and 80%, respectively) in chronic patients than Bz (80 and 94%, respectively in each of the studies) [16,17].

Drug repurposing comes side by side with the possibility of combining drugs, as it is already the established treatment protocol for diseases like malaria and tuberculosis [18]. Recently, the repurposing of Nf and its combination to eformithine (NECT formulation) to treat second stage gambiense sleeping sickness in Africa has been made available and represents an upgrade in patient care, demonstrating positive outcomes [19,20]. The combination of licensed drugs enables cost reduction and reduces side effects, as well as provides a wider arsenal against neglected diseases, improved efficacy and finally possible changes in posology and administration, which encourages patient adherence to treatment [6]. Besides, this strategy allows as much as the attack of different targets in the parasite, as the bypass or even avoidance of drug resistance, and has been largely claimed as an alternative for CD therapy [14,21].

Metronidazole (Mtz) (Fig. 1) is a nitroimidazole derivative with wide antibacterial activity and proven antiprotozoal efficacy, currently used for the treatment of giardiasis [22] and trichomoniasis

[23]. In 1983, Agosin [24] demonstrated that *T. cruzi* epimastigotes can uptake and metabolize Mtz, triggering ultrastructural changes in the morphology of the treated parasites such as altered endoplasmic reticulum profiles and mitochondrial membrane insults [25]. Later, some preliminary studies reported the use of Mtz in chagasic patients, but the results were very inconclusive [26,27], which hindered further research.

Thus, aiming to contribute to the identification of alternative therapeutic proposals for CD, presently the trypanocidal activity of Mtz in mono- and combined therapy associated with Bz against *T. cruzi* infection was explored using *in vitro* and *in vivo* validated models.

2. Materials and methods

2.1. Drugs

Benznidazole (Bz) was purchased from Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil), and metronidazole (Mtz) was donated by Instituto de Tecnologia em Fármacos da Fundação Oswaldo Cruz (Farmanguinhos/Hocruz) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). For *in vitro* tests, stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) with the final concentration of the solvent never exceeding 0.6%, which did not exert any toxicity to the parasite or mammalian host cells [28]. For *in vivo* tests, Bz was prepared in distilled and sterile water supplemented with 3% Tween 80 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) as described [29], while Mtz was dissolved in distilled and sterile water.

2.2. Parasites

Trypanosoma cruzi bloodstream trypomastigotes of the Y strain (BT) (DTU II) were obtained from Swiss Webster mice at the parasitemia peak. The purified parasites were resuspended in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) as previously reported [30,31]. *T. cruzi* trypomastigotes of the Tulahuén strain (DTU VI) expressing the β -galactosidase gene from *Escherichia coli* were collected from the supernatant of infected cell cultures of L929 cell lineage, as in the literature [32,33].

2.3. Mammalian cell cultures

Primary cardiac cell cultures (CC) were obtained from mice embryos and plated in 96-well plates previously coated with

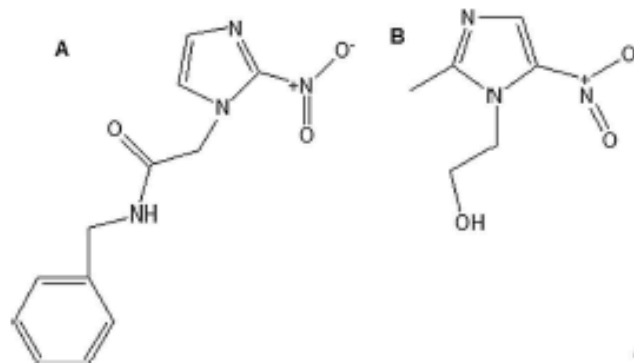


Fig. 1. Chemical structures of benznidazole (A) and metronidazole (B).

0.01% gelatin [30]. Mouse 1929 fibroblast cell line (4×10^3 cell/well into 96-well plates) was maintained at 37 °C in RPMI-1640 medium (pH 7.2–7.4) without phenol red, supplemented with 10% FBS and 2 mM glutamine (RPMI), as described [33].

2.4. In vitro trypanocidal activity

For monotherapy assays, bloodstream and intracellular forms were screened. 5×10^6 per ml. BT were incubated for 24 h at 37 °C in RPMI in the presence or not of Mtz and Bz, in serial diluted non-toxic concentrations (up to 200 μ M). After incubation, the number of living parasites was determined through direct quantification in light microscopy using a Neubauer chamber and the EC_{50} calculated (drug concentration able to reduce to 50% the number of parasites) [28]. For the assay on intracellular forms, 1929 cell cultures were infected with culture-derived trypomastigotes (Tulahuen strain expressing β -galactosidase) in a 10:1 parasite:host cell ratio and after 2 h, the cultures were washed to remove non-internalized parasites and further incubated for another 48 h to establish infection. Then, Mtz and Bz were added in non-toxic increasing concentrations and again incubated for 96 h at 37 °C to determine the EC_{50} values. Henceforth, 50 μ L of the substrate (CPRC – chlorophenol red glycoside) 500 mM in 0.5% Nonidet P40 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) were added to the in vitro system and incubated for 18 h at 37 °C. The plate was read in a spectrophotometer and the absorbance measured at 570 nm. The results were expressed as the percent inhibition of the infection rate [28].

For combinatory therapy, drug interactions between Mtz and Bz were assessed using a fixed-ratio method [34] using 1929 cell cultures infected with Tulahuen strain expressing β -galactosidase under the same protocol above described. To establish the top concentrations, the pre-determined EC_{50} value of Bz (24 μ M) was used to ensure that it fell near the midpoint of a six-point two-fold dilutions series; using fixed-ratio solutions based on 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 proportions [35,28]. All the in vitro assays were performed at least in duplicate and results on average are for at least three independent experiments. The combination protocol was performed by adding Bz and Mtz simultaneously.

2.5. In vivo assays

Female and male Swiss Webster mice (18–23 g) were obtained from the Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). Maximal of six mice were housed per cage and were kept in a conventional room at 20–24 °C under a 12 h/12 h light/dark cycle. The animals were provided with sterilized water and chow *ad libitum*. All procedures were carried out in conformity to the guidelines established by the Hocruz Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA LW16/14).

2.6. Mouse acute toxicity

To determine the no-observed-adverse-effect level (NOAEL), Swiss Webster female mice (20 to 23 g, $n = 2$ per assay, two assays) were treated orally (per oral = p.o.) with progressive doses of Mtz (up to 2000 mg/kg of body weight = 2000 mpk). Treated animals were inspected for toxic and sub-toxic symptoms according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines. 48 h after compound administration, the NOAEL values were determined as previously reported [36]. Blood of these mice was collected and submitted to biochemical analysis at the Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil), to determine alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatine

kinase (CK), creatinine and urea levels [29]. The animals were then euthanized and their organs (kidney, liver, heart and spleen) were collected, longitudinally cut, rinsed in ice-cold PBS, and fixed in 10% formaldehyde (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) in PBS. The tissues were dehydrated and embedded in paraffin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) and sections (5 μ m) were stained by routine hematoxylin-eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, United States) and analyzed by light microscopy.

2.7. Mice infection and treatment schemes

Male mice (18–20 g, $n = 6$ per assay, two assays) were infected (10^4 parasites per mice) intraperitoneally with BT and two different protocols were assayed, the mono- and the combined therapy. In all assays, only animals with positive parasitemia were included and as reference drug, Bz was given p.o. in optimal (100 mpk) and sub-optimal (10 mpk) doses. As negative control, uninfected and *T. cruzi* infected mice were treated only with distilled and sterile water (vehicle) in parallel. For monotherapy, mice received p.o. fixed non-toxic doses of Mtz, ranging from 62.5 to 1000 mpk for five consecutive days (once a day), starting on the 5th day post infection (dpi) that corresponds to the parasitemia onset in this experimental acute model [29]. For combined therapy, infected animals were treated simultaneously p.o. with Bz 10 mpk + Mtz 250 mpk and Bz 10 mpk + Mtz 500 mpk.

2.8. Parasitemia, mortality rates and electrocardiogram (ECG)

Parasitemia was individually checked by direct microscopic counting of parasites in 5 μ L of blood as in the Pizzi-Brener method [37], and mortality rates checked daily until the 30th day post treatment and expressed as percentage of cumulative mortality (% CM) as described elsewhere [38]. Electrocardiographic parameters were evaluated in non-sedated mice according to previous studies [39].

2.9. Statistical analysis

The statistical analysis was done individually for each assay using Student's T-test and ANOVA with the level of significance set at $p \leq 0.05$.

3. Results

Our first step was to evaluate the trypanocidal effect of Mtz *in vitro*, in mono- or combined therapy, under a head-to-head comparison to Bz, the standard drug for CD. According to Table 1, Mtz alone was inactive (displaying EC_{50} values $>200 \mu$ M) against both parasite forms that are relevant for human infection: BT and intracellular. Oppositely, the activity range of Bz was from 11.5 to 2.51 μ M on the same tests, respectively (Table 1). Following these assays, Mtz was combined to Bz in fixed-ratio proportions, according to pre-established protocols, and tested against intracellular forms in 1929 cells, establishing the top fixed concentrations related to the Bz EC_{50} value (Fig. 2). The findings demonstrated a clear decrease in the range of Bz EC_{50} when Mtz was associated (Fig. 2). The EC_{50} of Bz alone was $11.17 \pm 0.42 \mu$ M and a mean $5.28 \pm 1.77 \mu$ M could be verified when Bz was combined with Mtz, being the lowest level of EC_{50} ($4.36 \pm 1.58 \mu$ M) detected when the Bz:Mtz ratio of 1:3 was used.

Then, as an improvement of Bz activity was found in interaction with Mtz and due to the lack of toxicity profile of this last drug to mammalian host cells *in vitro* (Table 1), their combination was directed to *in vivo* analysis. Prior to exploring the activity against the experimental *T. cruzi* infection in murine models, we

Table 1

In vitro trypanocidal activity (IC_{50}) of metronidazole and benznidazole against bloodstream trypomastigotes (Y strain) and intracellular forms (Tulahuén strain), as well as mammalian host cell toxicity (CC_{50}) and the corresponding selectivity index (SI).

	Mean \pm SD (μ M)					SI
	Bloodstream trypomastigotes	CC ^a	SI	Amastigotes	LD25 ^b	
Metronidazole	>200	>200	nd ^c	>200	>200	nd
Benznidazole	11.5 \pm 1.08	>200	>17.4	2.51 \pm 0.93	19.06 \pm 13.4	>76

^a CC = Cardiac cell cultures.

^b LD25 = LD25 at 1 time.

^c nd = not determined.

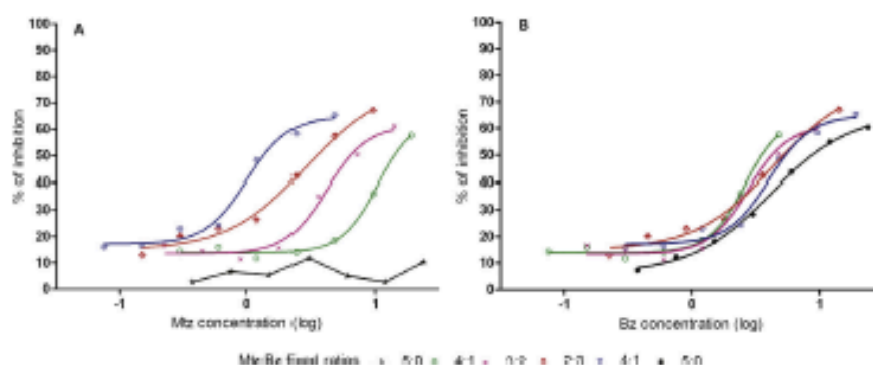


Fig. 2. *In vitro* trypanocidal combinatory analysis of metronidazole (Mtz) and benznidazole (Bz) against intracellular forms (Tulahuén strain). Dose-response curves of metronidazole (Mtz) (A) and benznidazole (Bz) (B), and the respective fixed-ratio combinations.

performed the acute toxicity evaluation of Mtz according to the OECD guidelines, and determined the non-toxic doses for the therapeutic protocols. The mice received *p.o.* progressive doses of Mtz up to 2000 mpk and our results demonstrated absence of clinical side effects on the treated mice that did not show altered levels of ALT, AST, CK, creatinine and urea (data not shown), being the NOAEL >2000 mpk. The histopathological analysis corroborated these findings, since the studied tissues (kidney, liver, heart and spleen) presented unaltered morphological characteristics. All organs exhibited preserved architecture and absence of degeneration, necrosis, pigment deposition and/or any inflammatory process that could relate to toxicity induced by Mtz (Fig. 3).

For the efficacy studies, Mtz was administered for five days *p.o.* in monotherapy in different doses, starting treatment on the 5 dpi, when all animals already exhibited positive parasitemia. While a parasitemia suppression and full protection against mice cumulative death was achieved with Bz (100 mpk), Mtz was not able to induce parasitemia reduction at any tested dosage (≤ 500 mpk) in relation to the vehicle treated animals, (Fig. 4A). Nevertheless, the regimens of 250 and 500 mpk promoted a protection regarding life span, reaching maximal reductions of 50% in animal mortality, whereas the vehicle treated animals were all dead by the 18 dpi (Fig. 4C). Next, as no toxic profile was noticed in preliminary acute studies (NOAEL 2000 mpk) and aiming to check if increased drug concentration would improve the anti-parasitic effect *in vivo*, a second assay was conducted employing higher concentrations of Mtz (≤ 1000 mpk). As above observed, the findings demonstrated that although not able to control the parasite burst (Fig. 4B), a statistically significant protection ($p = 0.04$) against mice mortality was achieved with Mtz, reaching 66% of reduction of death rates using the 500 mpk regimen, while higher doses were not successful possibly due to solubility issues (Fig. 4D).

In parallel, in order to assess whether drug interaction could result in higher *in vivo* anti-parasitic effect, 250 and 500 mpk

Mtz were combined to Bz at its suboptimal dose (10 mpk). The data were compared using the reference drug alone at optimal and suboptimal doses (100 and 10 mpk, respectively) (Fig. 5). The results failed to demonstrate reduction of the parasite peak levels among the tested groups in relation to those animals that only received vehicle (untreated group), while 100 mpk Bz suppressed the parasitemia, as expected (Fig. 5A). Nevertheless, a longer survival rate was again promoted, reaching maximum protection using Bz 10 + Mtz 250 regimen (Fig. 5B). Importantly, the ECG analysis of the surviving mice (Bz 100 and Bz 10 + Mtz 250 groups) demonstrated that the combinatory approach prevented in a more effective way the alterations of the electric cardiac system induced by experimental *T. cruzi* infection, mainly concerning the atrioventricular conduction (PR interval), as compared to the monotherapy of Bz at optimal dose (Fig. 6A). The ECG tracings on Fig. 6B exemplify the mentioned atrioventricular disturbance for the Bz 100 animals (circled), while the other tracings show no differences between the non-infected group and the combined therapy. The other evaluated parameters did not demonstrate any significant differences among the groups (Fig. 6A). Thus, our results suggest that the combined therapy reduces the incidence of atrioventricular blockages (AVB) protecting the electric conduction system of the heart of the animal experimentally infected with *T. cruzi*.

4. Discussion

Metronidazole is a nitroimidazolic derivative with broad spectrum of anti-parasitic activity [40]. It is in use for the treatment of giardiasis [22] and trichomoniasis [23]. *De novo* drug discovery and drug development are very long and costly processes, so the repurposing strategy has been largely stimulated as an alternative to treat several pathologies, mainly neglected diseases, since the steps related to drug pharmacokinetics and safety profile are already defined and approved by the regulatory authorities [41].

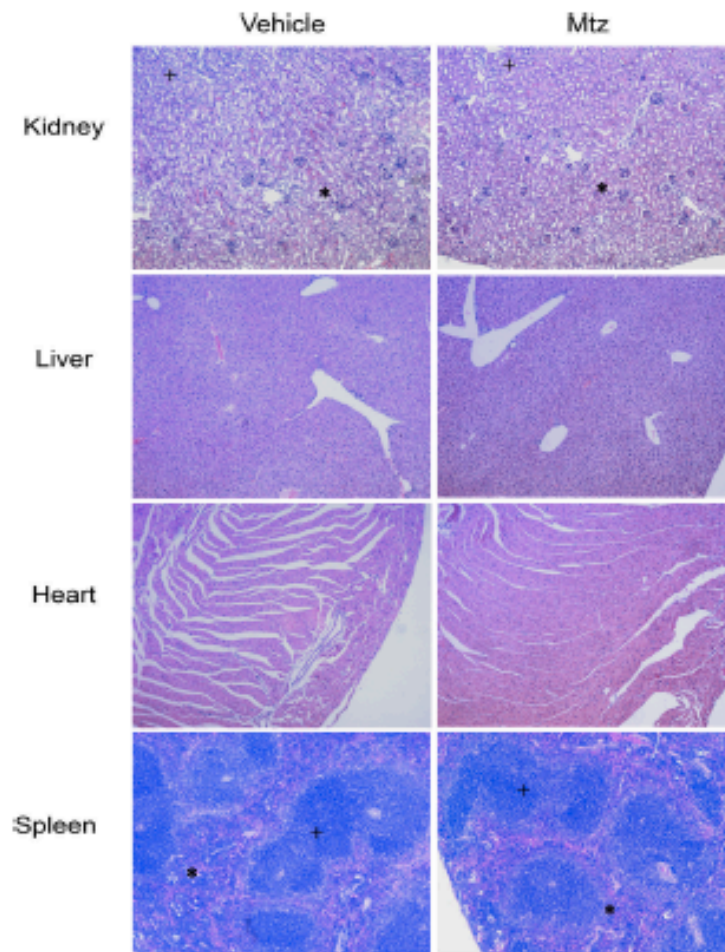


Fig. 3. Histological images of kidney, liver, heart and spleen tissues from Swiss Webster female mice collected after 48 h of oral administration of vehicle and 2000 mg/kg metronidazole (Mtz) during the acute toxicity analysis. Normal architecture of organs and no evidence of toxicological changes. Kidney: normal cortex (*) and medulla (+). Red (black arrow) and white pulp (white arrow) of spleen without histopathological findings. Original magnification of 100X, H.E. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

The potential trypanocidal effect of Mtz in monotherapy has been poorly explored against *T. cruzi* with most studies performed several decades ago, sometimes using other *Trypanosoma* species (as *T. dionisii*) as in vitro model for anti-*T. cruzi* screening assays [42]. Regarding the effect on chagasic patients, in 1970, Levi and Neto [26] administered reasonably multiple high doses of Mtz in a prolonged scheme and reported that the drug was in general well tolerated, although not able to improve the chronic patients' clinical conditions, describing a positive and persistent level of antibody against *T. cruzi*. Another clinical report of an acute case in Honduras treated with Mtz three times a day for 15 days confirmed the safety profile of this drug, although the anti-*T. cruzi* antibody level remained positive [27]. Later in 1993, Blandón and colleagues [43] treated acute and chronic patients with Mtz in Panama, using different therapeutic schemes according to the phase of the disease. Once again, the tolerability of the drug was showed, but now patients without cardiomyopathy presented a

clearance in the parasitemia, while the other ones maintained its positivity for the parasite. Thus, as few literature data are available in experimental models as well as for chagasic patients, our aim was to reevaluate the potential trypanocidal effect of Mtz upon *T. cruzi* (in vitro and in vivo studies) using highly standardized protocols also exploring the potential benefit of combining Mtz with Bz [33,29].

Our in vitro and in vivo tests corroborated the safety profile previously described for Mtz. We demonstrated that Mtz is non-toxic and perfectly well tolerated by mice up to very high doses (2000 mpk, as assayed). However, at the same time, it did not demonstrate any promising result as a trypanocidal agent, with EC_{50} values higher than 200 μ M, thus resulting in low selectivity indexes, much lower than Bz. In order to check if Mtz could improve the efficacy of Bz, we moved forward to combination protocols [28]. Although the test presented an absence of interaction, the striking aspect was that Mtz improved Bz activity, as

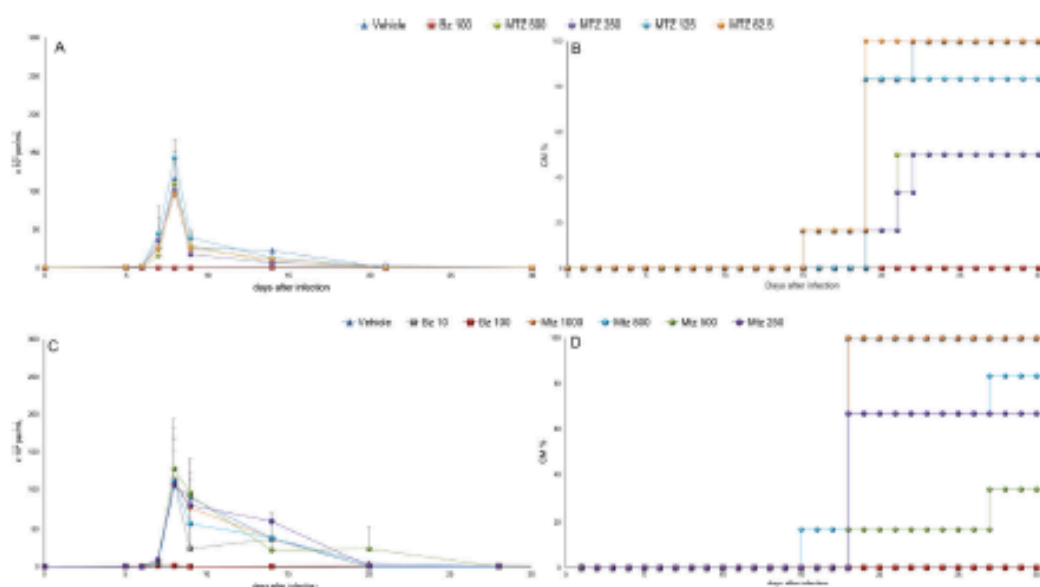


Fig. 4. Effect of metronidazole (Mtz) and benznidazole (Bz) in monotherapy upon experimental *T. cruzi* infection. Parasitemia analysis (A and C) and the respective cumulative mortality (CM) (B and D).

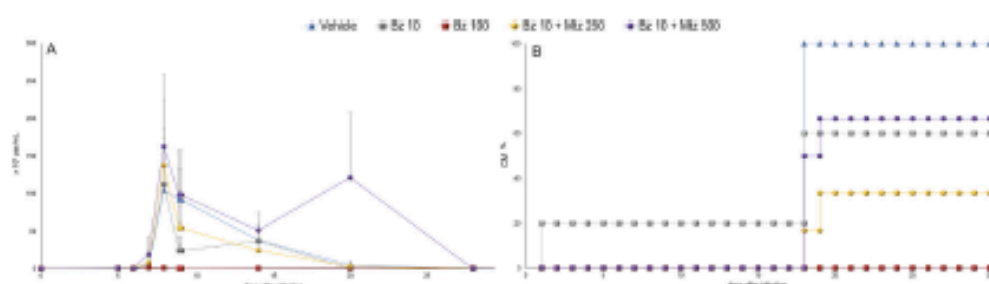


Fig. 5. Effect of metronidazole (Mtz) in association with benznidazole (Bz) upon experimental acute *T. cruzi* infection. Parasitemia analysis (A) and cumulative mortality (CM) (B).

shown in Fig. 2. The *in vitro* interaction between Mtz and Bz against *T. cruzi* was evaluated via fixed-ratio dilutions. The significant reduction of EC_{50} of Bz when co-administered with Mtz indicates the beneficial effect of the Bz:Mtz combination and justifies its evaluation *in vivo* using mice as an experimental model. Since Mtz and Bz are nitroimidazole compounds, the improved trypanocidal *in vitro* effect of Bz in this combination could be related to an increased oxidoreductase activity. Imidazoles may interfere with the parasite energetic metabolism, especially in the mitochondrion, and induce DNA fragmentation [44], although other possible targets cannot be discarded.

Therefore, we followed to *in vivo* analysis using mouse models of acute *T. cruzi* infection, initially using monotherapy schemes. Although no parasitemia decrease was noticed, an enhancement in the survival levels was achieved at 250 and 500 mpk in comparison to the vehicle-treated infected group. For the highest doses administered of 800 and 1000 mpk, as previously mentioned, there was no toxicity effect on the mice, but these high doses presented lower solubility than the other concentrations, and that probably influenced the absence of response of these regimens.

Regarding the animal models presently used, it is important to note that, even though male and female mice may differ in their response to toxicity studies [45], as well as in the course of the experimental infection of *T. cruzi* [46], only females were used for *in vivo* acute toxicity tests, once they are more sensitive to variations in drug systemic concentration. On the other hand, only male mice were used for the experimental infection and respective treatment, because in this case they represent higher stringent models for identification of novel drug candidates for Chagas disease [46].

The lack of activity of Mtz *in vivo* in monotherapy corroborated the *in vitro* data. On the other hand, as we demonstrated that Mtz influenced Bz activity *in vitro*, we moved forward to the *in vivo* combinatory therapy, aiming to verify its impact on parasitemia levels and mortality rates. When a suboptimal dosage of Bz (which is 10% of the standardized for this model) with the best protective dosages of Mtz (250 and 500 mpk, respectively) was applied, the combination also did not reduce the parasitemia levels. Nevertheless, the Bz 10 + Mtz 250 group prolonged in 70% the survival time of the animals in relation to the vehicle-treated

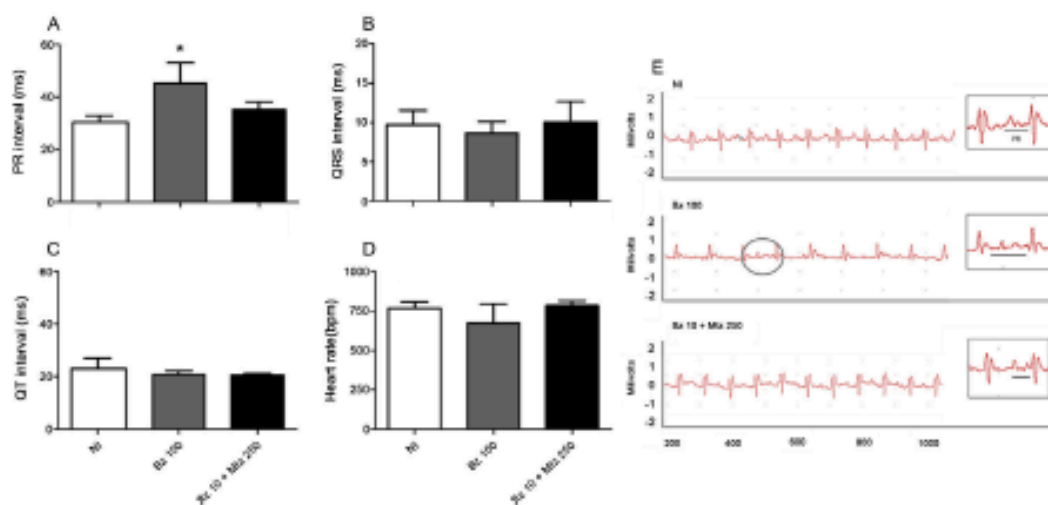


Fig. 6. Electrocardiography (ECG) of the surviving animals from non-infected (NI), *T. cruzi* infected and treated with benzimidazole monotherapy (Bz 100 mpk) and benzimidazole combined with metronidazole (Bz 10 mpk + Mtz 250 mpk) groups at the 300 h day post infection. The analysis show the electrical conduction system of the heart through the conduction time of each respective interval: PR (A), QRS (B) and QT (C) in milliseconds (ms), as well as the cardiac frequency in heartbeats per minute (bpm) (D) as demonstrated on the ECG tracings (E). *Statistical analysis (Student's T test) $p \leq 0.05$.

animals. Besides, the later scheme protected against heart electric conduction disturbance and kept a normal cardiac function, as represented by the ECG tracings. Meanwhile, the group of mice treated with Bz at the optimal dosing presented a noteworthy AVB that was not observed in the non-infected control group. In experimental acute *T. cruzi* infection, AVB and other ECG alterations are commonly observed [39]. Collectively our findings demonstrated a mild protection of Mtz upon experimental infection of *T. cruzi*: while no decrease in parasite load could be observed, an important protection against mortality and altered electric cardiac profile was obtained when the combination of Mtz and Bz was assayed, confirming the promising aspect of both strategies, drug repurposing and combined therapy, presently investigated. These results were in line with Moreira da Silva et al. [47], that verified an increase in the volume of distribution and elimination half-life of Bz when co-administered with itraconazole. The authors suggest that itraconazole can alter the pharmacokinetics of Bz after oral administration in mice and this alteration could be therapeutically useful. Thus, a similar phenomenon might be occurring, resulting in decreased cardiac dysfunctions as observed for the animal combination group (Bz 10 + Mtz 250) with reduced incidence of alterations in the ECG parameters than Bz 100 mpk alone.

Pharmaceutical companies and governments normally overlook some infectious conditions, what makes them neglected diseases. They mainly affect the poor population, and the struggle of researchers with the screening of new compounds leads to even more questions about the future of the treatment for most of these infections. Thus, our study emphasizes the importance of working with different approaches for CD, naming the drug repositioning and combined therapy, reassuring the well-established methodologies for drug testing. In this sense, we showed that repurposing a commercial cheap drug for CD can be feasible and it is possible to reduce the time from industry to shelves. Moreover, it is likewise logical the assessment of this approach or in combination with other medicines not only for parasitemia levels' reduction, but also to improve life quality for the patients.

Conflicts of interest

None.

Acknowledgements

The authors would like to thank Ludmila Fiuza for technical support. We also would like to praise the Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos/Fiocruz for donating the metronidazole. The fundings were provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ). MNCS and MTB are CNPq fellows. MNCS is Cientista do Nosso Estado CNE FAPERJ.

References

- [1] A.C. Ausfelder, W. Sals, M. Madden, J. Streitz, J. Baillet, F. Gohl, et al., A 5,000-year record of Chagas' disease, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101 (2004) 2034–2039.
- [2] A. Araújo, A.M. Jensen, K. Reinhard, L.F. Ferreira, Paleoparasitology of Chagas disease – a review, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (Suppl 1) (2009) 9–16.
- [3] C. Chagas, *Nova tripanosomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi, gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 1 (1909) 159–218. Portuguese.
- [4] A. Prata, Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease, *Lancet Infect. Dis.* 1 (2) (2001) 92–100.
- [5] A.J. Rossi, A. Rassi, A. Marin-Neto, Chagas disease, *Lancet* 375 (2010) 1388–1402.
- [6] P.J. Hotez, B. Pezard, S. Rijal, C. Bonham, S. Alroy, M. Malecek, et al., Eliminating the neglected tropical diseases: translational science and new technologies, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10 (3) (2016) e0004805.
- [7] J.R. Gura, Chagas disease: control, elimination and eradication, is it possible? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108 (8) (2013) 962–967.
- [8] WHO (World Health Organization), Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on estimates, *Wkly. Epidemiol. Rec.* 2015 (30) (2015) 33–43.
- [9] J. Gascon, C. Bern, M.J. Pinazo, Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries, *Acta Trop.* 115 (1–2) (2010) 22–27.

- [10] C. Bem, S. Kjos, M.J. Yabsley, S.P. Montgomery, *Trypanosoma cruzi* and Chagas' disease in the United States, *Clin. Microbiol. Rev.* 24 (2011) 655–681.
- [11] J.R. Coura, P.A. Vilas, A.C. Junqueira, *Epidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 109 (7) (2014) 856–862.
- [12] J.R. Coura, A.C. Junqueira, *Ecological diversity of Trypanosoma cruzi transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon*, *Acta Trop.* 151 (2015) 51–57.
- [13] J. Bernades, C. Davies, A. Simonazzi, J.P. Real, S. Palma, *Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease*, *Acta Trop.* 156 (2016) 1–16.
- [14] E. Chatelain, *Chagas disease drug discovery: toward a new era*, *J. Biomol. Screen.* 20 (2015) 22–35.
- [15] *Drugs for Neglected Diseases Initiative [homepage on the Internet]. Chagas disease Target Product Profile*. Available from: <http://www.dndi.org/diseases-projects/target-product-profile.html> (accessed April 4, 2017).
- [16] C.A. Morillo, H. Watkins, S. Sosa-Sitani, B. Bangler, M. Del Carmen, C. Castro, on behalf of the STOP-CHAGAS Investigators, *Benzimidazole and posaconazole in eliminating parasite in asymptomatic T. cruzi carriers: The STOP-CHAGAS Trial*, *J. Am. Coll. Cardiol.* 69 (8) (2017) 939–947.
- [17] I. Molina, I. Gómez, J. Post, F. Salvador, B. Trivello, E. Sulleiro, N. Serra, et al., *Randomized trial of posaconazole and benzimidazole for Chronic Chagas' disease*, *N. Engl. J. Med.* 370 (20) (2014) 1905–1908.
- [18] A. Nisik, Z. Ma, K. Chibale, *Drug repositioning in the treatment of malaria and TB*, *Future Med. Chem.* 3 (11) (2011) 1413–1426.
- [19] C. Schmid, A. Kuonenrohe, J. Blum, S. Ghafari, V. Kende, W. Mutschler, et al., *In-hospital safety in field conditions of nilfartinox-eflornithine combination therapy (NECT) for T. h. gambiense sleeping sickness*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6 (11) (2012) e1920.
- [20] E. Alimi, D. Schumpf, J. Anici Henadi, A. Rindol, C. de Patou, M. Quere, et al., *Nilfartinox-eflornithine combination therapy for second-stage gambiense human African trypanosomiasis: Médécins Sans Frontières experience on the Democratic Republic of the Congo*, *Clin. Infect. Dis.* 56 (2) (2013) 195–203.
- [21] J.R. Coura, *Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 (4) (2009) 549–554.
- [22] E. Hinaon, S. Maravich, S.G. Svitek, *An up-to-date on Giardiasis and giardiasis*, *Curr. Opin. Microbiol.* 34 (2016) 47–52.
- [23] C.B. Meneses, A.P. Fossion, T. Tassi, *Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide?* *Microb. Cell* 3 (9) (2016) 404–410.
- [24] M. Aguin, *The aerobic metabolism of metronidazole by Trypanosoma cruzi epimastigotes*, *Comp. Biochem. Physiol.* 75 (2) (1983) 311–315.
- [25] J.J. Paula, R. White Jr., M. Aguin, *Ultrastructural modifications during the metabolism of metronidazole by Trypanosoma cruzi*, *J. Submicrosc. Optol.* 15 (4) (1983) 951–964.
- [26] G.C. Levi, V.A. Neto, *Tratamiento, pelo metronidazol, de pacientes con a forma crónica da doença de Chagas*, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* IV (3) (1970) 173–175. Portuguese.
- [27] H.N. Lainez, E.S. Fernandez, *Forma aguda de la enfermedad de Chagas, importancia seriológica del Signo de Romana – Informe de los dos primeros casos en Honduras*, *Ver. Med. Hondur.* 30 (1971) 5–15. Spanish.
- [28] M.R. Simões-Silva, A.S.G. Nefertiti, J.S. De Araújo, M.M. Batista, P.B. Da Silva, M. T. Bahia, et al., *Phototypy: screening in vitro of novel aromatic amides against Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (2016) 4701–4707.
- [29] F.H. Guedes-da-Silva, D.G. Batista, C.F. De Silva, J.S. De Araújo, B.P. Pavão, M.R. Simões-Silva, et al., *Anti-trypanosomal activity of novel 14- α -demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VPIV in the Swiss mouse models of Chagas disease induced by the Trypanosoma cruzi Y strain*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 61 (4) (2017) pii:02008–16.
- [30] M.N. Meiniltes, T.C. de Araújo-Jorge, C.F. Miranda, W. de Souza, H.S. Barbosa, *Interaction of Trypanosoma cruzi with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro*, *Eur. J. Cell. Biol.* 41 (2) (1988) 198–206.
- [31] D.G. Batista, M.M. Batista, G.M. Oliveira, P.B. Amarel, J. Lennox-Vieira, C.M. Brito, et al., *Arylimidamide D8786, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 2940–2952.
- [32] F.S. Buckner, C.J. Verlinde, A.C. La Plante, W.C. Van Voorhis, *Efficient technique for screening drugs for activity against Trypanosoma cruzi using parasites expressing beta-galactosidase*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 40 (11) (1996) 2302–2307.
- [33] A.J. Romanha, S.L. De Castro, M.N.C. Soares, J. Lennox-Vieira, I. Ribeiro, A. Takam, et al., *In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease*, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 105 (2010) 233–238.
- [34] Q.L. Fineman, I.S. Adaji, D.C. Wetsuit, *Modified fluid-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 (11) (2004) 4097–4102.
- [35] L.F.J. Diniz, J.A. Urbina, I.M. de Andrade, A.L. Mazzoni, T.A. Martins, I.S. Caldas, et al., *Benzimidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments*, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7 (8) (2013) e2367.
- [36] C.F. Da Silva, G. Batista Dda, G.M. Oliveira, E.M. De Souza, E.R. Hammer, P.B. Da Silva, et al., *In vitro and in vivo investigation of the efficacy of arylimidamide D87831 and its methylated salt form – D87985 – against Trypanosoma cruzi infection*, *PLoS One* 7 (1) (2012) e30356.
- [37] Z. Brenner, *Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi*, *Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo* 4 (1962) 386–396.
- [38] F.H. Guedes-da-Silva, D.G. Batista, M.B. Mezzari, K.C. Demerque, T.O. Pulco, J.S. Araújo, et al., *In vitro and in vivo trypanocidal action of novel arylimidamides against Trypanosoma cruzi*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 60 (4) (2016) 2425–2434.
- [39] J.D.S. Campos, L.Y. Hoppa, T.L.A. Duque, S.L. De Castro, G.M. Oliveira, *Use of noninvasive parameters to evaluate Swiss Webster mice during Trypanosoma cruzi experimental acute infection*, *J. Parasitol.* 102 (2) (2016) 280–285.
- [40] F.J. Roe, *Metronidazole: review of uses and toxicity*, *J. Antimicrob. Chemother.* 3 (3) (1977) 205–212.
- [41] M. Kaiser, P. Mäker, L.P. Taddei, J.-R. Loset, R. Brun, *Antiprotazoal activity profiling of approved drugs: a starting point toward drug repositioning*, *PLoS One* 10 (8) (2015) e0135556.
- [42] J.R. Baker, L.F. Selden, *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisi as a model for chemotherapeutic studies related to Chagas's disease*, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75 (1) (1981) 80–85.
- [43] R. Blandón, C.M. Johnson, O. Sousa, I. Iramendi, J.F. Guevara, *The clinical experience in Panama with metronidazole in treating Chagas' disease in the acute and chronic phases*, *Rev. Med. Panama* 18 (2) (1993) 94–100.
- [44] T. Kumar, D. Wansa, R.F. Menna-Barreto, W.D. Valença, E.N. da Silva Júnior, I.N. Nambuthiri, *Synthesis of imidazoles via cascade reaction of nitroalkyl acetates with amides and studies on their trypanocidal activity*, *Org. Biomol. Chem.* 13 (7) (2015) 1996–2000.
- [45] R.L. Sipnick, J.A. Grubisic, R.N. Hill, R.D. Bruce, K.A. Stitzel, A.P. Waller, I. Chu, M. Goldard, L. Sogal, J.A. Springer, R.C. Myers, *Comparison of the up-and-down, conventional LD50, and fixed-dose acute toxicity procedures*, *Food Chem. Toxicol.* 33 (3) (1995) 223–231.
- [46] F.H. Guedes-da-Silva, D.G. Batista, C.F. da Silva, M.B. Mezzari, M.R. Simões-Silva, J.S. de Araújo, C.G. Ferreira, O.C. Moreira, C. Brito, G.I. Lopaniva, Mde N. Soares, *Different therapeutic outcomes of benzimidazole and VNI treatments in different genders in mouse experimental models of Trypanosoma cruzi infection*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 59 (12) (2015) 7564–7570.
- [47] R. Moreira da Silva, L.T. Oliveira, N.M. Silva Barcellos, J. de Souza, M. de Lana, *Preclinical monitoring of drug association in experimental chemotherapy of Chagas' disease by a new HPLC-UV method*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (6) (2012) 3344–3348.

3.2 Artigo 2 (aceito para publicação)

“Repurposing strategies for Chagas disease therapy: the effect of imatinib and derivatives against *Trypanosoma cruzi*”

Estratégias de reposicionamento para a terapia de doença de Chagas: o efeito de imatinib e derivados contra *Trypanosoma cruzi*

Imatinib foi racionalmente desenvolvido em indústria farmacêutica, exclusivamente para o tratamento de leucemia mielóide crônica. Devido à sua atividade como inibidor enzimático de tirosina quinases, seu potencial como agente antiparasitário, assim como de 14 novos análogos foram presentemente investigados contra infecção experimental por *T. cruzi*.

Preview

From: andrew.hemphill@vetsuisse.unibe.ch

To: soeiro@ioc.fiocruz.br

CC:

Subject: PARASITOLOGY: Manuscript Accepted manuscript ID PAR-2018-0328.R2

Body: 07-Feb-2019

Dear Dr. Soeiro

Manuscript ID: PAR-2018-0328.R2

Title: Repurposing strategies for Chagas disease therapy: the effect of imatinib and derivatives against *Trypanosoma cruzi*

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Parasitology and will now be sent to Press.

It is now essential that:

1) If applicable, you mail publishers' permissions to use previously published material from other sources to the following address:

Journals Production
Cambridge University Press
Shaftesbury Road
Cambridge
CB2 8BS
UK

Your manuscript cannot be processed until all relevant documentation has been received.

Finally, we are keen to promote articles wherever possible. If your institution is planning to issue a press release relating to your article there are a number of ways the journal's marketing team can assist you. Please email the details of any planned press releases to the journal's Marketing Executive, Fran Robinson (frobinson@cambridge.org).

Yours sincerely,
Prof. Andrew Hemphill

Editor
Parasitology

Date Sent: 07-Feb-2019

Repurposing strategies for Chagas disease therapy: the effect of imatinib and derivatives against *Trypanosoma cruzi*

Simões-Silva MR^a, De Araújo JS^a, Peres RB^a, Da Silva PB^a, Batista MM^a, De Azevedo LD^{b,c}, Bastos MM^b, Bahia MT^d, Boechat N^b and Soeiro MNC^{a*}

^a Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^b Laboratório de Síntese Orgânica, Instituto de Tecnologia em Fármacos – Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-900 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^c Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas – ICB, Centro de Ciências da Saúde - CCS, Bloco J, Ilha do Fundão, 21941-599 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ^d Laboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Medicina & Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Campus Universitário, Morro do Cruzeiro s/nº, 35400-000 Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

*Corresponding author: M.N.C. Soeiro soeiro@ioc.fiocruz.br at Laboratório de Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21040-360 Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

Running title: Imatinib and derivatives against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a neglected parasitic condition endemic in the Americas caused by *Trypanosoma cruzi*. Patients present an acute phase that may or not be symptomatic, followed by lifelong chronic stage, mostly indeterminate, or with cardiac and/or digestive progressive lesions. Benznidazole (BZ) and nifurtimox are the only drugs approved for treatment but not effective in the late chronic phase and many strains of the parasite are naturally resistant. New alternative therapy is required to address this serious public health issue. Repositioning and combination represent faster, and cheaper trial strategies encouraged for neglected diseases. The effect of imatinib (IMB), a tyrosine kinase inhibitor designed for use in neoplasias, was assessed *in vitro* on *T. cruzi* and mammalian host cells. In comparison with BZ, IMB was moderately active against different strains and forms of the parasite. The combination IMB+BZ in fixed-ratio proportions was additive. Novel 14 derivatives of IMB were screened and a 3,2-difluoro-2-phenylacetamide (**3e**) was as potent as BZ on *T. cruzi* but had low selectivity index. The results demonstrate the importance of phenotypic assays, encourage the improvement of IMB derivatives to reach selectivity and testify to the use of repurposing and combination in drug screening for CD.

Key words: Chagas disease; drug repurposing; imatinib; imatinib derivatives; *in vitro*

Key Findings

- In comparison to benznidazole, IMB was moderately active on *Trypanosoma cruzi*.
- The combination of benznidazole and IMB in fixed-ratio proportions was additive.
- IMB derivative 3,2-difluoro-2-phenylacetamide (**3e**) was active on *T.cruzi* with low selectivity.
- Drug repositioning must be encouraged in drug discovery strategy for Chagas disease.

1. Introduction

Chagas disease (CD) is a neglected parasitic infection that affects more than six million people worldwide, most of them living in the Americas in extreme poverty without access to diagnosis or proper treatment (Chatelain 2016; WHO 2015). Caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, CD is a silent and progressive disease with two phases: acute and chronic (Chatelain 2016). During the acute phase, the patient may present mild flu-like symptoms or not, and after six to nine weeks, enters the long-lasting chronic phase that is predominantly indeterminate (70 % of the diagnosed cases), opposing to 30-40 % of the patients, that can, years or decades later, develop clinic signs characterized by cardiac and/or digestive pathology (Prata 2001; Rassi et al 2010). The therapy for CD is based in two drugs, benznidazole (BZ) and nifurtimox, both in use for more than five decades. However, both present severe side effects, limited efficacy on the later chronic phase besides the occurrence of naturally resistant parasite strains to these nitroderivatives (Bermudez et al 2016).

Nowadays, drug repurposing strategies have been used in attempt to find alternative therapies for diseases that lack etiological or adequate drug treatment (Nwaka and Hudson 2006). The approach is especially relevant for the neglected diseases reducing time and budget in drug discovery process (Ashburn and Thor 2004). In addition to that, combined therapy is as well an interesting strategy for enabling the simultaneous action towards more than one target, to overcome natural or acquired resistance (Ashburn and Thor 2004; Cha et al 2018; Sun et al 2016).

Imatinib (IMB) is a rationally designed BCR-ABL tyrosine kinase (TK) inhibitor broadly used for neoplasias, such as chronic myeloid leukemia (CML) and gastrointestinal stromal tumor (Cruz-Rico et al 2013; Musumeci et al 2015; Rix et al 2007). New analogues and derivatives of IMB have been synthesized and screened not only for neoplasias, but also for parasitic pathologies like malaria (Pathak et al 2015), schistosomiasis (Beckmann et al 2014; Buro et al 2014), filariasis (O'Connell et al 2015), leishmaniasis (Wetzel et al 2012), human African trypanosomiasis (Behera et al 2014) and CD (Engel et al 2010).

The scope of our study was to explore drug repositioning by evaluating the potential trypanocidal activity of IMB, also assessing its use in combination with BZ. The phenotypic activity of 14 novel IMB derivatives against the different forms and strains of *T. cruzi* was also investigated.

2. Materials and Methods

2.1 Drugs

Benznidazole (BZ – Figure 1) was purchased from Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Recife, Pernambuco, Brazil). Imatinib mesylate (IMB – Figure 1) and the derivatives (1a – c, 1e, 2a – e and 3a – e – Figure 2) were provided by Dr Núbia Boechat from the Laboratório de Síntese Orgânica - Instituto de Tecnologia em Fármacos / Fundação Oswaldo Cruz (Farmanguinhos/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) and synthesized as reported (Azevedo et al 2017). Stock solutions in dimethyl sulfoxide (DMSO) were prepared w/v with the final concentration never exceeding 0.6 %, which does not exert mammalian host cell toxicity as reported (Timm et al 2014). The highest concentration was 50 μ M as some of the derivative molecules slightly precipitated (light microscopy observation) using higher concentrations.

2.2 Mammalian cell cultures

Mouse fibroblasts from L929 cell line (4×10^3 cell/well into 96-well plates) were cultivated in RPMI-1640 medium (pH 7.2-7.4) without phenol red (Gibco BRL) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) and 2 mM glutamine at 37 °C (Romanha et al 2010). Primary cardiac cell cultures (cc) were prepared from hearts

isolated from 18-20 days-old mice embryos and seeded in 96 and 24-well plates previously coated with 0.01 % gelatin (Meirelles et al 1986).

2.3 Parasites

Trypomastigotes of Tulahuen strain (DTU VI) expressing the β -galactosidase gene from *Escherichia coli* were obtained from the supernatant of infected L929 cell line cultures, as described (Buckner et al 1996; Romanha et al 2010). Bloodstream trypomastigotes (BT) of Y strain (DTU II) were obtained at the parasitemia peak from infected Swiss Webster mice and then resuspended in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM), supplemented with 10 % FBS (Batista et al 2010; Meirelles et al 1986). Culture-derived trypomastigotes (CT) of the Y strain were obtained from the supernatant of L929 cell cultures (10:1 parasite : cell ratio) as described (Batista et al 2010).

2.4 Cell toxicity assessment

Non-infected cc and L929 cultures were incubated at 37 °C for 24-48 and 96 hours, respectively, with increasing concentrations of each compound (up to 50 μ M) diluted in RPMI. The morphology, and the spontaneous contractibility of cc was evaluated by light microscopy and cellular viability was determined by the PrestoBlue (cc) and AlamarBlue (L929) tests, as standardized (Romanha et al 2010; Simões-Silva et al 2016). The results were expressed as the difference in reduction between treated and non-treated cells according to the manufacturer's instructions, and the value of LC₅₀ (minimum concentration that reduces the cellular viability by 50%) was determined. Also, toxicity on mammalian cells were assessed using combination schemes of IMB with BZ as described below (item 2.5.2). Selectivity index was expressed as the ratio between the mean values of the CC₅₀ for host cells, and the EC₅₀ for the parasites or infected cell cultures (SI: CC₅₀/EC₅₀). All SIs were done comparing always the same time of drug exposure for each parasites and mammalian cells: 24 hours for BT and CT, 48 hours for intracellular and extracellular amastigote forms of Y strain, and 96 hours for intracellular forms of Tulahuen strain, as reported (Batista et al 2010; Romanha et al 2010).

2.5 Trypanocidal activity

2.5.1 Monotherapy

BT and CT of Y strain ($5 \times 10^6/\text{mL}$) were incubated for 2 and 24 hours at 37°C in RPMI with 1:3 serial dilutions of the compounds (0-50 μM) for determination of parasite death rates, through the direct quantification of live parasites by light microscopy. The EC_{50} (compound concentration that reduces the number of parasites by 50%) was then calculated (Simões-Silva et al 2016; Timm et al 2014). For the analyses of compound effect on intracellular forms, *T. cruzi*-infected L929 cultures (Tulahuen strain) were incubated for 96 hours at 37°C with each compound using 1:3 serial dilutions (0-50 μM) in RPMI. After the incubation, 500 μM chlorophenol red- β -D-galactopyranoside (CPRG) in 0.5% Nonidet P40 was added to each well (final concentration 50 μM) and the plate incubated for 18 hours at 37°C . The absorbance was measured at 570 and 600 nm using a spectrophotometer. Controls with uninfected cells and infected cells, both treated only with vehicle and/or with BZ, were run in parallel for each plate in order to determine the EC_{50} values (Romanha et al 2010). To test the potency against other parasite strain, the selected compounds were evaluated on the infection of cc using the Y strain. After 24 hours of interaction (10:1 parasite and host cell ratio), the cc were incubated for 48 hours using 1:3 serial dilutions of the compounds (0-50 μM), rinsed with saline, fixed with Bouin, stained with Giemsa and examined by light microscopy (Simões-Silva et al 2016). The percentage of infected host cells was determined, as well as the number of parasites per cell and the infection index, which represents the product of the multiplication between the percentage of infection and the number of parasites per cell. Then, the EC_{50} values were determined based on the infection indexes.

Regarding the effect on extracellular amastigotes (Y strain), the parasites were purified from the supernatant of highly infected cardiac cell culture (parasite : host cell ratio: 50:1) (De Souza et al 2010). Then, 5×10^6 parasites/mL were incubated for 48 hours at 37°C with increasing concentrations of the studied compounds ($\leq 50 \mu\text{M}$) and parasite death rates quantified by light microscopy for EC_{50} determination (De Souza et al 2010). The maximum time of drug exposure was set according to the characteristics of parasite viability (for trypomastigotes the maximum was 24 hours, since longer *in vitro* cultivation decreases viability (BT) or induces cell differentiation (CT)), and due to the previous standardized protocols for each parasite strain (Batista et al 2010; Romanha et al 2010).

2.5.2 Combined therapy

Drug interactions were investigated using a fixed-ratio method (Fivelman et al 2004) by combining IMB with BZ, in L929 cell cultures infected with Tulahuen strain expressing β -galactosidase, according to the same protocol above described. Predetermined EC_{50} values were used to determine the top concentrations of the individual ratios ensuring that it fell in the midpoint of a seven-point 2-fold dilution series. The fixed ratios of 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 and 0:5 were used, as reported (Simões-Silva et al 2016).

2.6 Determination of FIC index, isobologram preparation and nature of drug interaction

Fractional inhibitory concentrations (FICs) and the sum of FICs (Σ FICs) were calculated as follows: $FIC_{IMB} = EC_{50} \text{ of IMB in combination} / EC_{50} \text{ of IMB in monotherapy}$. The same equation was applied to the partner drug BZ. The Σ FICs = $FIC_{IMB} + FIC_{BZ}$. An overall Σ FICs was determined and used to classify the nature of each interaction. Isobolograms were built by plotting the EC_{50} of IMB against the EC_{50} of BZ (Diniz et al 2013; Simões-Silva et al 2016). Σ FICs ≤ 0.5 = synergism; $0.5 < \Sigma$ FICs ≤ 4.0 = additive (no interaction); Σ FICs > 4.0 = antagonism.

2.7 Ethics

Swiss mice (21-23 g) were provided by the Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Brazil). They were kept in a conventional room at 20-24 °C under a 12/12 hours light/dark cycle. The animals were supplied with sterilized water and chow ad libitum. The procedures complied to the guidelines of the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA LW16/14).

2.8 Statistical analysis

The assays were done in at least duplicate and the results were on average from three independent experiments. ANOVA tests were performed and the significance level set for $p \leq 0.05$ only for those compounds that presented higher potency than the reference drugs.

3. Results

Following our well-established flowchart, the activity against intracellular forms of *T. cruzi* (Tulahuen strain – DTU VI) was done using L929-infected cell cultures treated or not with IMB and BZ in serial dilutions (0 – 50 μM) and readout using colorimetric analysis. As presented in Table 1, IMB displayed a moderate trypanocidal activity ($\text{EC}_{50} = 24.8 \pm 7.4 \mu\text{M}$) in comparison to BZ ($\text{EC}_{50} = 4.1 \pm 1.3 \mu\text{M}$). When mammalian cells viability was evaluated, IMB exhibited higher toxicity than BZ after 96 hours of incubation ($\text{CC}_{50} = 38.3 \pm 0.2$ and $> 50 \mu\text{M}$, respectively) (Table 1). To expand the analysis to other parasite strains and other mammalian host cells, IMB was screened against intracellular forms of the Y strain (DTU II) inside cc, besides evaluating its potential cardiotoxicity profile. After 48 hours of drug exposure, IMB and BZ were not toxic up to 50 μM (Table 1). The readout of Giemsa-stained *T. cruzi*-infected cc by light microscopy showed the trypanocidal activity of IMB, being able to reduce both the percentage of infected host cells as well as the number of parasites per infected cell (data not shown). Regarding the infection index, the EC_{50} values for IMB and BZ were $20.0 \pm 4.4 \mu\text{M}$ and $2.8 \pm 1.9 \mu\text{M}$, respectively (Table 1). Aiming to validate the trypanocidal activity of IMB directly against amastigotes without the possible drug influence on the mammalian host cell machinery, free parasites released from a highly infected cardiac culture were incubated also for 48 hours. The results confirmed the in vitro moderate effect of IMB, reaching EC_{50} values of $30.0 \pm 4.4 \mu\text{M}$ (Table 1).

IMB was assayed against culture-derived trypomastigotes (CT) and bloodstream trypomastigotes (BT) of the Y strain and the data showed EC_{50} values of $43.3 \pm 19.0 \mu\text{M}$ and $33.6 \pm 4.9 \mu\text{M}$ for CT and BT, respectively, after 24 hours of incubation (Table 2).

Since BZ and IMB present distinct modes of action, which means acting on different targets, IMB was combined with BZ for drug interaction assays with fixed-ratio and serially diluted concentrations (Figure 3, Table 3). The isobologram shows that the interaction between both drugs was additive (mean $\sum\text{FICs} = 0.91$) (Figure 3), and all the $\sum\text{FIC}$ for each combination ratio demonstrated that none of them was synergistic (Table 3). The best non-toxic ratio was two parts of IMB to three parts of BZ, with the $\sum\text{FIC} = 0.68$ (Table 3). Toxicity upon L929 cell lines was only observed for the highest concentrations, reaching 91 % of loss of cellular viability for 200 μM IMB + 4.8 μM BZ (ratio 4:1, data not shown).

The moderate activity of IMB against different forms and strains of *T. cruzi* motivated the next step performing the phenotypic screening of 14 new analogues. The compounds (Figure 2) were assayed under the same *in vitro* established models above reported. The toxicity assessment against L929 cell line cultures demonstrated that 1a, 1b, 2c, 3a and 3d were not toxic up to 50 μM after 96 hours of incubation (Table 4). However, the other compounds displayed distinct levels of mammalian cells toxicity ranging from 8 to 48 μM (Table 4). When the derivatives were screened using L929-infected cell cultures (Tulahuen- β galactosidase strain), ten derivatives, listing 1a, 2a – e, 3a and 3c – e, presented considerable activity, with EC_{50} values below 10 μM (Table 4). 1a, 2d and 3c were most potent ($\text{EC}_{50} \leq 3.8 \mu\text{M}$) than BZ, being at least six-fold more active than IMB (Tables 1 and 4, $p \leq 0.05$).

The toxicity assays performed on cc for 24 hours revealed that none of the derivatives was cardiotoxic up to 50 μM (Table 4). Then, the ten compounds active against intracellular forms (Tulahuen strain) were tested against BT (Y strain). Compounds 1a, 2a, 2c, 2e, 3a and 3c showed no trypanocidal activity up to 50 μM (Table 4). The best trypanocidal molecule was 3e ($\text{EC}_{50} = 7.4 \mu\text{M}$), being five-fold more active than IMB ($p \leq 0.05$) (Tables 2 and 4). This derivative investigated on *T. cruzi*-infected cc (Y strain) displayed EC_{50} values of $1.3 \pm 0.4 \mu\text{M}$ with $\text{SI} > 38$ (Table 5), in the same activity range of BZ (Table 1).

4. Discussion

The focus of the study was to access the phenotypic profile of IMB and the 14 novel derivatives, by using different strategies recommended for the drug discovery of Chagas disease: drug repurposing and combination, thus aiming to contribute for the identification of novel therapies more specific towards the parasite and less dangerous to mammalian cells.

IMB is a TK inhibitor with high selectivity for ABL kinases, mostly present in tumorigenic cells (Cruz-Rico et al 2013; Musumeci et al 2015). The activity of IMB has also been demonstrated against several pathogens, including helminths (Beckmann et al 2014; Buro et al 2014; O'Connell et al 2015) and protozoa (Behera et al 2014; Pathak et al 2015; Wetzel et al 2012), suggesting the repurposing potential of this drug.

As suggested for CD flowchart screenings (Romanha et al 2010), the toxicity profile of IMB and derivatives was explored using different host cells (primary cardiac

cells and fibroblasts of L929 cell lines). The trypanocidal effect was investigated upon the relevant forms of the parasite for mammalian infection (amastigotes and trypomastigotes) (Brenner and Chiari 1963) obtained from different sources (culture-derived and bloodstream trypomastigotes, intracellular and extracellular amastigotes) and from distinct strains, which are susceptible (Tulahuen strain) and the partially naturally resistant to nitroderivatives (Y strain) belonging to different discrete typing units – DTUS VI and II, respectively (Zingales et al 2012).

Our present results demonstrate the moderate activity of IMB against *T. cruzi* *in vitro* using different parasite strains and forms, corroborating previous studies reported against strains obtained from chronic chagasic patients (CA-I/72 clone and PSD-1), and clones derived from insect (Sylvio-X10/7 clone and its parental strain) (Engel et al 2010, Dichiara et al 2017). Analogues of TK are present in protozoa such as trypanosomatids, including *T. cruzi*, and have been related to several parasite metabolic processes besides playing a role during host cell invasion (Melo et al 2014). IMB was moderately active against *Plasmodium falciparum* (Pathak et al 2015) and *Leishmania amazonensis* (Wetzel et al 2012), being the enzyme inhibition demonstrated. However, IMB was inactive against *Trypanosoma brucei gambiense*, although some of its analogues showed mild potency, especially lapatinib (Behera et al 2014), which was used as scaffold for new molecules further tested against *L. major*, *T. brucei* and *T. cruzi* with promising results (De Rycker et al 2016; Devine et al 2017).

In our studies, besides assessing the trypanocidal activity of IMB, 14 novel derivatives were studied using well-established *in vitro* methodologies for drug screening in *T. cruzi* (Romanha et al 2010). These new derivatives have the phenylamino-pyrimidine group as their main pharmacophore fragment and presented antitumor activity *in vitro* (Moreno et al 2010). The series 1a – e has hybrid molecules developed from IMB and sunitinib, another TK inhibitor. The molecules of series 2a – e have 2-oxo-2-phenylacetamides, the ones of series 3a – e have 3,2-difluoro-2-phenylacetamides, and isatins were used as starting molecules in all series (Azevedo et al 2017).

The TDR (Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization) establishes criteria for the determination of antiparasitic activity and selectivity of compounds in test: EC₅₀ lower than 4.0 µM are 'active', between 4.0 and 60 µM are 'moderately active', and higher than 60 µM are 'inactive'

against *T. cruzi* amastigotes (Papadopoulou et al 2015). Accordingly, although IMB presented a moderate anti-parasitic activity (against different parasite forms and strains of *T. cruzi*), with EC₅₀ values four to six folds higher than the reference drug (BZ). Some of the studied derivatives displayed an enhanced anti-*T. cruzi* effect, being active in micromolar range, which represents a dramatic improvement in the trypanocidal activity in relation to the scaffold molecule already reported in the literature (Engel et al 2010). The compounds 1a, 2a – e, 3a and 3c – e presented trypanocidal effects under 10 µM against intracellular forms of the Tulahuen strain, being more potent than IMB (EC₅₀ = 38.3 µM) and 3d and 3e exhibited superior/similar effect as BZ when assayed against BT. However, poor selectivity was achieved for most of them.

Moving forward, as combined therapy has been largely used for different diseases with promising results (Sun et al 2016), we investigated the trypanocidal effect of the IMB plus BZ. Although according to the sum of FICs (Σ FICs), the combination was additive, the FIC values differed among the fixed-ratio proportions suggesting that a combination of two parts of IMB to three parts of BZ might have a better predictive *in vivo* outcome than the monotherapies. Another interesting feature was the low toxicity profile of the combination IMB + BZ. L929 cellular viability dropped by 91 % only when higher concentrations of IMB were used, such as 200 µM IMB + 4.4 µM BZ. The strategy of combining compounds acting on distinct targets is promising as reported for other drug combinations (Santos et al 2018; Simões-Silva et al 2016), improving parasite killing. In this sense, approaches for the synthesis and development of novel imatinib derivatives using possibly a hybrid molecule composed by IMB derivatives (such as compound 3e) and BZ could be performed aiming to improve the activity and selectivity of these compounds as anti-*T. cruzi* agents.

5. Acknowledgements

The authors would like to thank MSc Ludmila Fiuza and Dr Gabriel Melo de Oliveira (LBC/IOC/Fiocruz) for their technical support.

6. Financial support

The fundings were provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio

de Janeiro (FAPERJ), PAEF and Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). MNCS and MTB are CNPq fellows. MNCS and NB are Cientista do Nosso Estado CNE FAPERJ.

Conflicts of interest: none.

7. References

- Ashburn, TT and Thor, KB** (2004) Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery* **3**(8):673-83. DOI: 10.1038/nrd1468
- Azevedo, LD, Bastos, MM, Vasconcelos, FC, Hoelz, LVB, Silva Junior, FP, Dantas, RF, de Almeida, ACM, de Oliveira, AP, Gomes, LC, Maia, RC, Boechat, N** (2017) Imatinib derivatives as inhibitors of K562 cells in chronic myeloid leukemia. *Medicinal Chemistry Research* **26**:2929-2941. DOI: 10.1007/s00044-017-1993-8
- Batista, DG, Batista, MM, Oliveira, GM, Amaral, PB, Lannes-Vieira, J, Britto, CM, Junqueira, A, Lima, MM, Romanha, AJ, Sales, Jr PA, Stephens, CE, Boykin, DW, Soeiro, MNC** (2010) Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**:2940-2952. DOI: 10.1128/AAC.01617-09
- Beckmann, S, Long, T, Scheld, C, Geyer, R, Caffrey, CR, Grevelding, CG** (2014) Serum albumin and α -1 acid glycoprotein impedes the killing of *Schistosoma mansoni* by the tyrosine kinase inhibitor Imatinib. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* **4**(3):287-95. DOI: 10.1016/j.ijpddr.2014.07.005
- Behera, R, Thomas, SM and Mensa-Wilmot, K** (2014) New chemical scaffolds for human african trypanosomiasis lead discovery from a screen of tyrosine kinase inhibitor drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**(4):2202-10. DOI: 10.1128/AAC.01691-13
- Bermudez, J, Davies, C, Simonazzi, A, Real, JP, Palma, S** (2016) Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Tropica* **156**:1-16. DOI: 10.1016/j.actatropica.2015.12.017
- Brener, Z and Chiari, E** (1963) Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **5**:220-44.
- Buckner, FS, Verlinde, CL, La Flamme, AC, Van Voorhis, WC** (1996) Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites

expressing beta-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**(11):2592-7.

Buro, C, Beckmann, S, Oliveira, KC, Dissous, C, Cailliau, K, Marhöfer, RJ, Selzer, PM, Verjovski-Almeida, S, Grevelding, CG (2014) Imatinib treatment causes substantial transcriptional changes in adult *Schistosoma mansoni in vitro* exhibiting pleiotropic effects. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**(6):e2923. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002923

Cha, Y, Erez, T, Reynolds, IJ, Kumar, D, Ross, J, Koytiger, G, Kusko, R, Zeskind, B, Risso, S, Kagan, E, Papapetropoulos, S, Grossman, I, Laifenfeld, D (2018) Pharma Perspective on Drug Repurposing. *British Journal of Pharmacology* **175**(2):168-180. Epub 2017 May 18. DOI: 10.1111/bph.13798

Chatelain, E (2016) Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Computational and Structural Biotechnology Journal* **15**:98-103. eCollection 2017. DOI: 10.1016/j.csbj.2016.12.002

Cruz-Rico, J, Garrido-Acosta, O, Anguiano-Robledo, L, Rodríguez-Wong, U, Pérez-Cruz, E, Sánchez Navarrete, J, Ruiz-Pérez, NJ, Montes-Vera, MR (2013) Imatinib: farmacocinética. *Revista del Hospital Juárez de México* **80**(1): 67-72.

De Rycker, M, Thomas, J, Riley, J, Brough, SJ, Miles, TJ, Gray, DW (2016) Identification of trypanocidal activity for known clinical compounds using a new *Trypanosoma cruzi* hit-discovery screening cascade. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **10**(4): e0004584. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004584

De Souza, EM, Nefertiti, AS, Bailly, C, Lansiaux, A, Soeiro, MN (2010) Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells *in vitro*. *Cell Tissue Research* **341**(1):173-80. DOI: 10.1007/s00441-010-0985-5

Devine, W, Thomas, SM, Erath, J, Bachovchin, KA, Lee, PJ, Leed, SE, Rodriguez, A, Sciotti, RJ, Mensa-Wilmot, K, Pollastri, MP (2017) Antiparasitic Lead Discovery: Toward Optimization of a Chemotype with Activity Against Multiple Protozoan Parasites. *Medicinal Chemistry Letters* **8**(3):350-354. DOI: 10.1021/acsmedchemlett.7b00011

Dichiara, M, Marrazzo, A, Prezzavento, O, Collina, S, Rescifina, A, Amata, E (2017) Repurposing of Human Kinase Inhibitors in Neglected Protozoan Diseases. *ChemMedChem* **12**(16):1235-1253. DOI: 10.1002/cmdc.201700259

Diniz, LdF, Urbina, JA, de Andrade, IM, Mazzeti, AL, Martins, TA, Caldas, IS, Talvani, A, Ribeiro, I, Bahia, MT (2013) Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**(8): e2367. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002367

Engel, JC, Ang, KK, Chen, S, Arkin, MR, McKerrow, JH, Doyle, PS (2010) Image-based high-throughput drug screening targeting the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**(8):3326-34. DOI: 10.1128/AAC.01777-09

Fivelman, QL, Adagu, IS and Warhust, DC (2004) Modified fixed-ratio isobologram method for studying *in vitro* interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**(11): 4097–4102. DOI: 10.1128/AAC.48.11.4097-4102.2004

Meirelles, MN, de Araujo-Jorge, TC, Miranda, CF, de Souza, W, Barbosa, HS (1986) Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *European Journal of Cell Biology* **41**(2):198-206.

Melo, TG, Tucci, AR, Nogueira, AR, Meirelles, Mde N, Pereira, MC (2014) The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology* **139**:49-57. DOI: 10.1016/j.exppara.2014.02.008

Moreno, BH, Cabanas, EG and Hitt, R (2010) Tyrosine Kinase Inhibitors in Treating Soft Tissue Sarcomas: Sunitinib in Non-Gist Sarcomas. *Clinical Translational Oncology* **12** (7): 468-472. DOI: 10.1007/s12094-010-0539-z

Musumeci, F, Schenone, S, Grossi, G, Brullo, C, Sanna, M (2015) Analogs, formulations and derivatives of imatinib: a patent review. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* **25**(12):1411-21. DOI: 10.1517/13543776.2015.1089233

Nwaka, S and Hudson, A (2006) Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* **5**(11):941-55. DOI: 10.1038/nrd2144

O'Connell, EM, Bennuru, S, Steel, C, Dolan, MA, Nutman, TB (2015) Targeting Filarial Abl-like Kinases: Orally Available, Food and Drug Administration-Approved Tyrosine Kinase Inhibitors Are Microfilaricidal and Macrofilaricidal. *Journal of Infectious Diseases* **212**(5):684-93. DOI: 10.1093/infdis/jiv065

Papadopoulou, MV, Bloomer, WD, Rosenzweig, HS, O'Shea, IP, Wilkinson, SR, Kaiser, M, Chatelain, E, Ioset, JR (2015) Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **23**(19):6467-76. DOI: 10.1016/j.bmc.2015.08.014

Pathak, V, Colah, R and Ghosh, K (2015) Tyrosine kinase inhibitors: New class of antimalarials on the horizon? *Blood Cells, Molecules and Diseases* **55**(2):119-26. DOI: 10.1016/j.bcmed.2015.05.007

Prata, A (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* **1**(2):92-100. DOI: 10.1016/S1473-3099(01)00065-2

Rassi, AJ, Rassi, A and Marin-Neto, A (2010) Chagas disease. *The Lancet* **375**:1388–1402. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)60061-X

Rix, U, Hantschel, O, Dürnberger, G, Remsing, Rix, LL, Planyavsky, M, Fernbach, NV, Kaupe, I, Bennett, KL, Valent, P, Colinge, J, Köcher, T, Superti-Furga, G (2007) Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. *Blood Journal* **110**(12):4055-63. Epub 2007 Aug 24. DOI: 10.1182/blood-2007-07-102061

Romanha, AJ, De Castro, SL, Soeiro, MNC, Lannes-Vieira, J, Ribeiro, I, Talvani, A, Bourdin, B, Blum, B, Olivieri, B, Zani, C, Spadafora, C, Chiari, E, Chatelain, E, Chaves, G, Calzada, JE, Bustamante, JM, Freitas-Junior, LH, Romero, LI, Bahia, MT, Lotrowska, M, Soares, M, Andrade, SG, Armstrong, T, Degraive, W, Andrade, ZA (2010) *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **105**:233-238.

Santos, CC, Lionel, JR, Peres, RB, Batista, MM, da Silva, PB, de Oliveira, GM, da Silva, CF, Batista, DGJ, Souza, SMO, Andrade, CH, Neves, BJ, Braga, RC, Patrick,

DA, Bakunova, SM, Tidwell, RR, Soeiro, MNC (2018) *In Vitro, In Silico, and In Vivo* Analyses of Novel Aromatic Amidines against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **25**;62(2). pii: e02205-17. DOI: 10.1128/AAC.02205-17

Simões-Silva, MR, Nefertiti, ASG, De Araújo, JS, Batista, MM, Da Silva, PB, Bahia, MT, Menna-Barreto, RS, Pavão, BP, Green, J, Farahat, AA, Kumar, A, Boykin, DW, Soeiro, MNC (2016) Phenotypic screening *in vitro* of novel aromatic amidines against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **60**:4701–4707. DOI: 10.1128/AAC.01788-15

Soeiro, Mde N, de Souza, EM, da Silva, CF, Batista, Dda G, Batista, MM, Pavão, BP, Araújo, JS, Aiub, CA, da Silva, PB, Lionel, J, Britto, C, Kim, K, Sulikowski, G, Hargrove, TY, Waterman, MR, Lepesheva, GI (2013) *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**(9):4151-63. Epub 2013 Jun 17. DOI: 10.1128/AAC.00070-13

Sun, W, Sanderson, PE, Zheng, W (2016) Drug combination therapy increases successful drug repositioning. *Drug Discovery Today* **21**(7):1189-95. DOI: 10.1016/j.drudis.2016.05.015

Timm, BL, Da Silva, PB, Batista, MM, Farahat, AA, Kumar, A, Boykin, DW, Soeiro, MNC (2014) *In vitro* investigation of the efficacy of novel diamidines against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* **141**(10):1272-6. DOI: 10.1017/S0031182014000407

Wetzel, DM, McMahon-Pratt, D and Koleske, AJ (2012) The Abl and Arg kinases mediate distinct modes of phagocytosis and are required for maximal *Leishmania* infection. *Molecular and Cellular Biology* **32**(15):3176-86. DOI: 10.1128/MCB.00086-12

World Health Organization (2015) Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. *Weekly Epidemiological Records* **90**: 33–43.

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. *Infection, Genetics and Evolution* **12**(2):240-53. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.12.009

LEGEND OF FIGURES

Figure 1. Chemical structures of benznidazole (**A**) and imatinib mesylate (**B**).

Figure 2. Chemical structures of imatinib derivatives.

Figure 3. Isobologram against intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* Tulahuen strain in L929 cell line. The EC_{50} of each compound is plotted on the abscissa and the ordinate, respectively. $\sum FICs \leq 0.5$ = synergism; $0.5 < \sum FICs \leq 4.0$ = additive (no interaction); $\sum FICs > 4.0$ = antagonism.

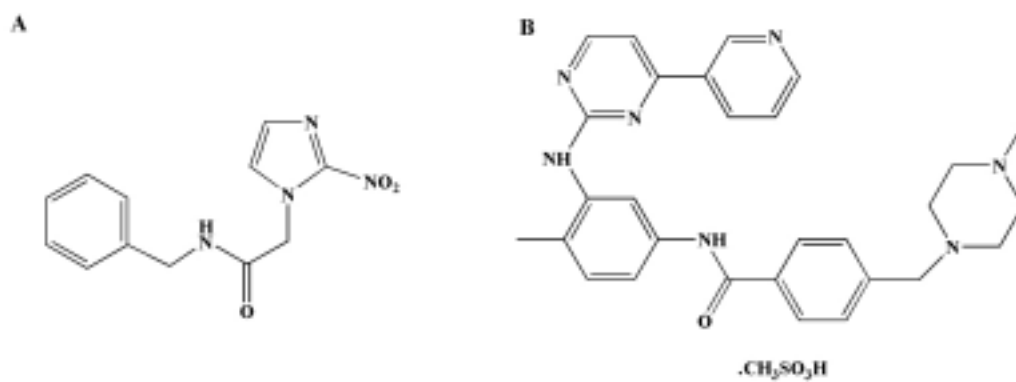


Figure 1. Chemical structures of benzimidazole (A) and imatinib mesylate (B).

185x68mm (300 x 300 DPI)

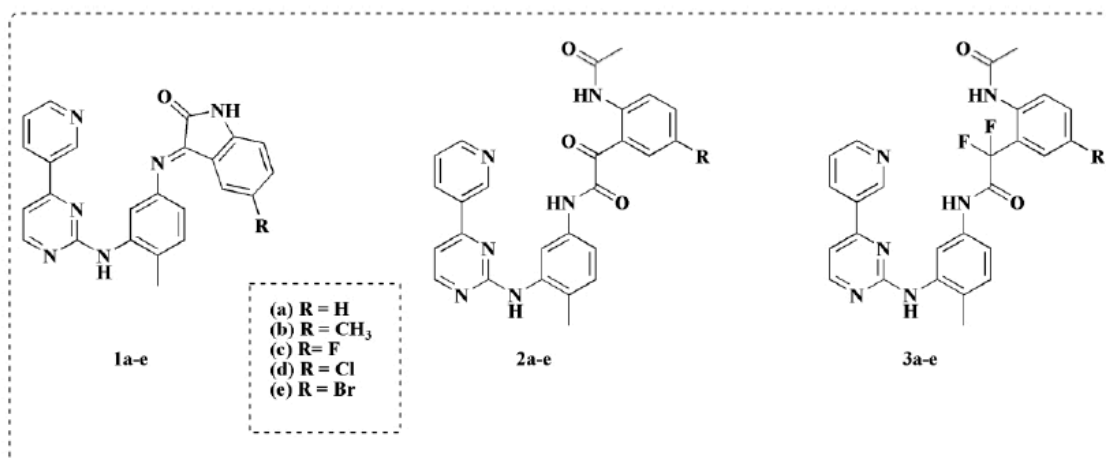


Figure 2. Chemical structures of imatinib derivatives.

198x82mm (300 x 300 DPI)

Table 1. *In vitro* trypanocidal activity (EC₅₀ - μM) of benznidazole and imatinib against amastigote forms (Tulahuen and Y strains of *Trypanosoma cruzi*, intra and extracellular sources), as well as cytotoxicity (CC₅₀ - μM) on different mammalian cells and their corresponding selectivity indexes (SI)

<i>T. cruzi</i> amastigote forms (strains and sources) and mammalian cells	Benznidazole	Imatinib
	Mean ± SD	
CC ₅₀ L929	>50	38.3 ± 0.2
EC ₅₀ intracellular (Tulahuen)	4.1 ± 1.3	24.8 ± 7.4
SI ^a	>12	1.5
CC ₅₀ cardiac cells	>50	>50
EC ₅₀ intracellular (Y)	2.8 ± 1.9 ^c	20.0 ± 4.4
SI ^b	>18	>2.5
CC ₅₀ cardiac cells	>50	>50
EC ₅₀ extracellular ^d (Y)	nd	30.0 ± 4.4
SI ^b	nd	>1.7

^a SI: CC₅₀/EC₅₀ obtained after 96 hours of drug exposure; ^b SI: CC₅₀/EC₅₀ obtained after 48 hours of drug exposure; ^c Soeiro et al. 2013; ^d extracellular amastigotes obtained from the supernatant of infected cardiac cells. nd: not determined.

Table 2. *In vitro* trypanocidal activity (EC₅₀ and EC₉₀ - μM) of benznidazole and imatinib against bloodstream (BT), culture-derived (CT) trypomastigotes from *Trypanosoma cruzi* Y strain, cytotoxicity on cardiac cells (CC₅₀ - μM) and the corresponding selectivity indexes (SI^a)

Time of drug exposure	Benznidazole		Imatinib	
	Mean ± SD			
	EC ₅₀ (SI)	EC ₉₀	EC ₅₀ (SI)	EC ₉₀
BT 2 h	>50 (nd)	>50	47.1 ± 9.5 (>1.1)	>50
BT 24 h	14.4 ± 3.4 (>3.5)	22.8 ± 7.8	33.6 ± 4.9 (>1.5)	45.7 ± 0.7
CT 24 h	nd	nd	43.3 ± 19.0 (>1.1)	>50
CC ₅₀				
Cardiac cells 24 h	>50		>50	

^a SI: CC₅₀/EC₅₀ obtained after 24 hours of drug exposure; nd: not determined

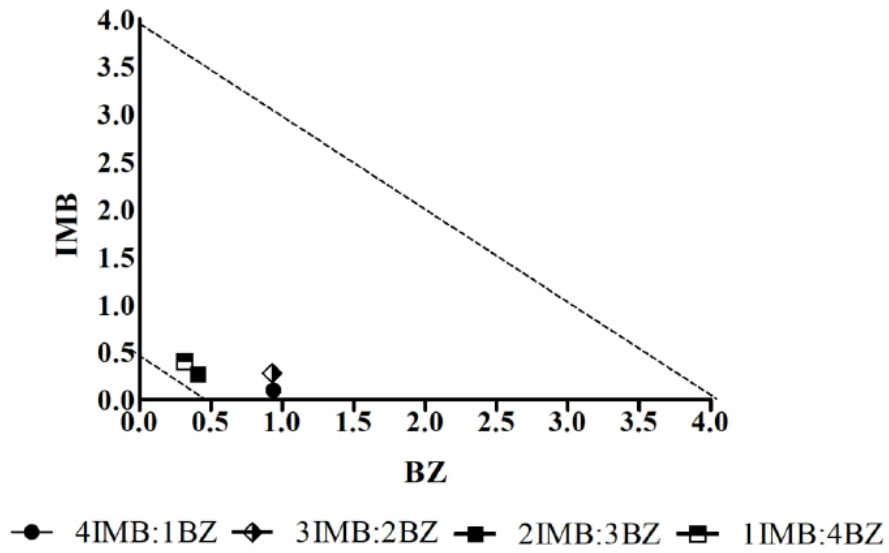


Figure 3. Isobologram against intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* Tulahuen strain in L929 cell line. The EC50 of each compound is plotted on the abscissa and the ordinate, respectively. $\Sigma\text{FICs} \leq 0.5$ = synergism; $0.5 < \Sigma\text{FICs} \leq 4.0$ = additive (no interaction); $\Sigma\text{FICs} > 4.0$ = antagonism.

124x77mm (300 x 300 DPI)

Table 3. Mean of Σ FICs of interaction between imatinib (IMB) and benznidazole (BZ) on intracellular forms of *Trypanosoma cruzi* Tulahuen strain in L929 cell line

IMB + BZ drug proportion	EC ₅₀ μ M		
	FIC - IMB	FIC - BZ	Σ FIC
4 + 1	0.94 \pm 0.24	0.10 \pm 0.02	1.04
3 + 2	0.93 \pm 0.04	0.28 \pm 0.07	1.21
2 + 3	0.41 \pm 0.12	0.27 \pm 0.08	0.68
1 + 4	0.32 \pm 0.00	0.4 \pm 0.00	0.72
Mean Σ FICs in combination	0.65	0.26	0.91

Top drug concentrations: 4+1 = 200 μ M of IMB plus 4.8 μ M of BZ; 3+2 = 150 μ M of IMB plus 9.6 μ M of BZ; 2+3 = 100 μ M of IMB plus 14.4 μ M of BZ; 1+4 = 50 μ M of IMB plus 19.2 μ M of BZ

Table 4. *In vitro* trypanocidal activity (EC₅₀) of imatinib derivatives against intracellular forms (Tulahuen strain, 96 hours of drug exposure) and bloodstream trypomastigotes (Y strain, 24 hours of drug exposure), as well as the cytotoxic concentration for mammalian cells (CC₅₀, 24 and 96 hours) and the corresponding selectivity index (SI)

Compounds	CC ₅₀ L929	EC ₅₀ Tulahuen/L929	SI ^a	CC ₅₀ CC	EC ₅₀ BT	SI ^b
1a	>50	3.8 ± 1.5	>13.2	>50	>50	nd
1b	>50	>50	nd	>50	nt	nd
1c	39.8 ± 0.8	30.5 ± 7.7	1.3	>50	nt	nd
1e	36.9 ± 3.2	11.6 ± 8	3.2	>50	nt	nd
2a	31.6 ± 1.1	6.8 ± 0.8	4.6	>50	>50	nd
2b	20.4 ± 5.1	5.7 ± 0.3	3.6	>50	39.2 ± 5.1	>1.3
2c	>50	6.7 ± 2.7	>7.5	>50	>50	nd
2d	8.3 ± 6.5	3.1 ± 0.6	2.7	>50	29.8 ± 5.0	>1.7
2e	11.9 ± 0.5	5.7 ± 0.6	2.1	>50	>50	nd
3a	>50	6.1 ± 2.5	>8.2	>50	>50	nd
3b	47.8 ± 0.3	27.4 ± 7.7	1.7	>50	nt	nd
3c	39.6 ± 9.6	2.0 ± 1.1	18.5	>50	>50	nd
3d	>50	6.1 ± 0.8	>8.2	>50	11.1 ± 0.6	>4.5
3e	14.3 ± 11.7	4.9 ± 1.9	2.9	>50	7.4 ± 0.7	>6.8

^a SI: CC₅₀/EC₅₀ obtained after 96 hours of drug exposure; ^b SI: CC₅₀/EC₅₀ obtained after 24 hours of drug exposure; nt: not tested; nd: not determined

Table 5. *In vitro* trypanocidal activity (EC₅₀ and EC₉₀- μM) of **3e**, an imatinib derivative, against intracellular amastigote forms of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* in mice primary cardiac cell culture and selectivity index (SI)

3e	EC ₅₀ (SI ^a)	EC ₉₀
Mean ± SD μM	1.3 ± 0.4 (>38.4)	>50

^a SI: CC₅₀/EC₅₀ obtained after 48 hours of drug exposure

3.3 Artigo 3 (aceito para publicação)

“Impact of levamisole in co-administration with benznidazole on experimental Chagas disease”

Impacto da coadministração de levamisole com benznidazole em doença de Chagas experimental

Levamisole é um medicamento antiparasitário de uso veterinário e humano para o tratamento de helmintíases. Possui também atividade imunomoduladora quando administrado em 1/4, 1/3 ou 1/2 da dose antiparasitária. No presente trabalho, ambas atividades foram investigadas em infecção murina aguda pelo *T. cruzi* com a administração do medicamento sozinho ou em combinação com o Bz.

* Alguns resultados não apresentados no manuscrito submetido encontram-se no **Apêndice A**.

Preview

From: parasitology@cambridge.org

To: soeiro@ioc.fiocruz.br

CC:

Subject: PARASITOLOGY: Manuscript Accepted manuscript ID PAR-2018-0354.R2

Body: 11-Mar-2019

Dear Dr. Soeiro

Manuscript ID: PAR-2018-0354.R2

Title: Impact of levamisole in co-administration with benznidazole on experimental Chagas disease

I am pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in Parasitology and will now be sent to Press.

It is now essential that:

1) If applicable, you mail publishers' permissions to use previously published material from other sources to the following address:

Journals Production
Cambridge University Press
Shaftesbury Road
Cambridge
CB2 8BS
UK

Your manuscript cannot be processed until all relevant documentation has been received.

Finally, we are keen to promote articles wherever possible. If your institution is planning to issue a press release relating to your article there are a number of ways the journal's marketing team can assist you. Please email the details of any planned press releases to the journal's Marketing Executive, Fran Robinson (frobinson@cambridge.org).

Yours sincerely,
Prof. Andrew Hemphill

Editor
Parasitology

Date Sent: 11-Mar-2019

Impact of levamisole in co-administration with benznidazole on experimental Chagas disease

Marianne Rocha Simões-Silva¹, Raiza Brandão Peres¹, Constança Britto², Cynthia Machado Cascabulho³, Gabriel de Melo Oliveira¹, Aline Nefertiti da Gama¹, Cristiane França da Silva¹, Karine Lima da Costa¹, Paula Finamore Araújo², Jerônimo Diego de Souza Campos¹, Marcos Meuser Batista¹, Kelly Cristina Demarque¹, Otacílio da Cruz Moreira², Maria de Nazaré Correia Soeiro^{1*}

¹ Laboratório de Biologia Celular, Pavilhão Cardoso Fontes, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas, Pavilhão Leônidas Deane, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Pavilhão Cardoso Fontes, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

**Corresponding author.* Maria de Nazaré Correia Soeiro, Laboratório de Biologia Celular, Pavilhão Cardoso Fontes, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Telephone: +552125621368. E-mail address: soeiro@ioc.fiocruz.br.

Running title: Effect of levamisole plus benznidazole on murine Chagas disease

ABSTRACT

Levamisole (Lms) is an anthelmintic drug with immunomodulatory activity. Chagas disease (CD) is caused by *Trypanosoma cruzi* and there is very low access to the drugs available, benznidazole (Bz) and nifurtimox, both far from ideal. In a drug repurposing strategy to test potential activity as antiparasitic and immunomodulatory agent for CD, Lms was assayed on acute *T. cruzi* murine infection, alone and in co-administration with Bz. During protocol standardization, 100 and 10 mpk of Bz given for 5 consecutive days resulted in parasitemia suppression and 100 % animal survival only with the highest dose. Flow cytometry showed that both optimal (100 mpk) and suboptimal (10 mpk) doses of Bz equally decreased plasma levels of cytokines commonly elevated in this acute infection model. Lms alone (10 - 0.5 mpk) did not decrease parasitemia nor mortality rates. Co-administration was investigated using the suboptimal dose of Bz and different doses of Lms. While Bz 10 mpk did not alter parasitemia, the combo partially reduced it but only slightly promoted animal survival. This effect could be related to Th1 response modulation since IL-6 and IFN- γ were higher after treatment with the combo.

Key words: Chagas disease, levamisole, drug co-administration, immunomodulation

Key findings

- Levamisole (Lms) administration does not reduce mice parasitemia neither increases animal survival
- Lms 0.5-1 mpk + Benznidazole (Bz) 10 mpk partially reduces mice parasitemia.
- The combo potentiates IL-6 and IFN- γ levels in comparison to monotherapy.

1. Introduction

Levamisole (Lms) is a synthetic thiazole, originally used as an anti-helminthic drug (Lionel et al 1969; Scherb 1969). Also, scientists have shown its use as an immunomodulant agent with beneficial or harmful outcomes, depending on the dose regimen, the timing of the treatment, and the immune status of the patient (Brunner and Muscoplat 1980). Lms has been assayed as adjuvant therapy for infectious diseases (for example, cutaneous leishmaniases and malaria), *in vitro* and *in vivo*, as well as in clinical trials, again with opposite effects related to the posology and the immune status of the host. The applicability of immunomodulant agents for infectious diseases may represent relevant approach to overcome mechanisms of parasite drug resistance, as well as to avoid the subversion of host's immune response, that weakens the fight against these threats (Butler 1982; Köksal et al 2016; Maude et al 2014; Rezai et al 1988).

Chagas disease (CD) is a neglected infectious disease caused by the protozoa *Trypanosoma cruzi* and the patients urge for alternative treatments (Coura 2009; Scarim et al 2018). Infected people may or not present a mildly symptomatic flu-like acute phase and progress to a frequently silent and long chronic phase that can remain indeterminate for life or cause cardiac and/or digestive irreversible damages (Prata 2001). The only etiologic drugs available in the market are benznidazole (Bz) and nifurtimox, both related to severe side effects, low efficacy on chronic phase and naturally resistant strains (Filardi and Brener 1987; Rassi, Rassi and Marin-Neto 2010). Recent efforts have demonstrated the potential use of repurposing strategies for different parasitic diseases including CD. Fungicidal drugs acting as CYP 51 inhibitors (E1224 and posaconazole) reached clinical trials on chronic chagasic patients but unfortunately presented therapeutic failure (Morillo et al 2017; Torrico et al 2018).

Then, the search continues and among the approaches, we highlight drug repositioning and combo therapies as relevant strategies to help scientists providing faster and cheaper solutions. In this effort, we investigated the efficacy of Lms alone

and in co-administration with Bz for the treatment of experimental acute CD in murine model, assessing the antiparasitic activity and immunomodulatory potential of the combo in comparison with the standard treatment.

2. Materials and methods

2.1 Drugs

Benznidazole (Bz) was purchased from Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Brazil) and levamisole (Lms) from Janssen Pharmaceutica (Belgium). Bz was diluted in distilled water with 3 % Tween 80 (Sigma-Aldrich, United States), and Lms only in distilled and sterile water. All drugs were prepared in extemporaneous solutions. Each treated animal received no more than 100 µL of a solution, either intraperitoneally (i.p.) or per oral (p.o.).

2.2 Animals

Female (18 - 23 g) and male (11 - 13 g) Swiss Webster mice obtained from the Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) were housed in cages in a conventional room at 20 to 24°C under a 12 h/12 h light/dark cycle, with sterilized water and chow *ad libitum*. Groups were formed with maximum of five animals. All procedures were carried out according to the guidelines of Fiocruz Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA L38/17).

2.3 Mouse acute toxicity

Female mice (n = 2 per assay, 2 assays) received i.p. or p.o. staggering doses of Lms, every 2 hours, up to 100 mg/kg of body weight (mpk). Toxic and sub-toxic symptoms were ascertained to determine the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) according to the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). After 48 h of drug administration, the mice were euthanized for blood collection through cardiac puncture and hematological analyses were provided by the ICTB/Fiocruz, being the whole procedure performed like described elsewhere (Simões-Silva et al 2017).

2.4 Mice infection

Male mice (n = 5 per assay, 3 assays) were infected i.p. with 10⁴ blood trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain. The treated mice and the control group (infected

not treated) were composed only of animals with positive parasitemia at day 5 post infection (dpi). Assays also included a control group of not infected not treated animals.

2.5 Efficacy studies

Infected mice were treated (i.p. and p.o.) with different daily doses of Lms from 5 to 9 dpi. The groups received 10 - 0.5 mg/Kg of body weight (mpk) at the same time every day. Bz treatment (p.o.) at 10 and 100 mpk was given in parallel. Additionally, the co-administration (p.o.) using different doses of Lms (10 - 0.5 mpk) and 10 mpk of Bz were also evaluated. Infected not treated groups, as well as the not infected not treated received distilled water under the same treatment protocol. Finally, there were also some groups that got one single dose of the respective Lms scheme 24 h before the inoculum with *T. cruzi*, then following the above described 5-day therapy protocol.

2.6 Parasitemia, mortality rates and endpoint

Daily parasitemia was individually assessed by fresh blood sampling (5 μ L) since 5 dpi until the 30th day post treatment (dpt) as reported (Brenner 1962). Mortality was daily checked until 40 dpi, and death rate expressed as percentage of cumulative mortality (% CM) (Simões-Silva et al 2017). On the 30 dpt, surviving animals were euthanized for blood and heart collection.

2.7 Cytokines analyses

IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ , IL-6, IL-4 and IL-2 were evaluated in plasma samples by flow cytometry using BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Mouse Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit (BD Biosciences, United States), according to manufacturer's instructions. Samples were acquired in a BD FACSCalibur™ flow cytometer and data analysis were performed using the CBA analysis FCAP Array™ software (BD Biosciences, United States).

2.8 qPCR analyses

500 μ L of blood were diluted 1:2 in a volume of guanidine solution (6 M guanidine-HCl, 0.2 M EDTA) and heated for 90 s in boiling water. Guanidine-EDTA blood (GEB) samples were processed with the QIAamp DNA minikit (Qiagen, Germany) as previously described (Moreira et al 2013). Multiplex real-time qPCR assays targeting the *T. cruzi* satellite nuclear DNA and the exogenous internal

amplification control (plasmid pZErO-2 containing an insert from the *Arabidopsis thaliana* aquaporin gene, 40 amplification cycles) were performed as previously described (Duffy et al 2013). The standard curves for absolute quantification were constructed with 1/10 serial dilutions of total DNA obtained from a negative GEB sample spiked with 10⁵ parasite (Y strain) equivalents/mL of blood.

2.9 Statistical analysis

The statistical analysis was done individually for each assay using ANOVA, two-way ANOVA with Bonferroni post-test, and two tailed T-test.

3. Results

To determine Bz and Lms doses to be used in the co-administration assays, *T. cruzi*-infected mice were treated for 5 days and the results showed that Bz 100 mpk suppressed completely the parasitemia, while Bz 10 mpk promoted 10 % of increase on the 8 dpi, corresponding the peak of parasitemia, in relation to the not treated infected group (**figure 1A**). In addition, Bz 10 was not as efficient as Bz 100 in protecting against death: while the standard treatment kept all animals alive until the established endpoint, the suboptimal dose presented ≥ 30 % of mortality (**figure 1B**). At the same time, approximately 83 % of the infected not treated mice died down to the 40 dpi (**figure 1B**).

In this model of *T. cruzi* acute infection, statistically significant increased plasma levels of IFN- γ , TNF, IL-6 and IL-10 were found, in contrast to healthy animals, mainly with a striking enhancement of IFN- γ at the 6dpi, therefore denoting the induction of a highly inflammatory environment (**figure 2**). Both Bz doses showed a reduction of these cytokine levels, presenting a quite similar response (**figure 2**). IL-17A, IL-4 and IL-2 could not be detected in infected nor healthy animal samples, submitted or not to treatment.

The potential repositioning of Lms for CD was explored, starting by the evaluation of the toxicological aspects of the treatment. Although p.o. up to 100 mpk, no side effect was found, the i.p. administration of high doses (≥ 50 mpk), induced sudden death in both healthy (one out of two) and *T. cruzi*-infected mice (5 out of 5 animals) (data not shown). In Lms treated but non-infected mice, no alterations in hematological tests were found in comparison to untreated animals. The gross pathology demonstrated hemorrhagic aspects in the lung and altered liver

configuration (pale organ), that may be suggestive of vasculitis or disseminated intravascular coagulation (data not shown).

After the toxicology analysis, the antiparasitic capacity of Lms was assessed on acute mice infection model. All doses of Lms (either by i.p. or p.o.) exacerbated the parasitemia in relation to the infected not treated control group, providing low animal survival rates (data not shown).

Next, the co-administration (p.o. for five consecutive days at the same hour, starting at the parasitemia onset) of the suboptimal dose of Bz (10 mpk) with different Lms concentrations resulted in decreased parasitemia levels, reaching at the use of Lms 1 + Bz 10 around 28 % of reduction (mean of the results of two assays, range of suppression 20 - 36 %) (**figure 1A** and data not shown), in contrast to the respective Bz 10 alone that did not decrease parasitemia (**figure 1A**). Besides, this combo was also effective in shortening mortality rate in comparison to the infected not treated group, protecting 70 % of the animals, just like Bz 10 (**figure 1B**).

At the endpoint (40 dpi/30 dpt), the aforementioned cytokines were dosed in the blood of the surviving animals (**figure 3**). While comparing in the surviving animals, the levels of IFN- γ in Bz 10 and Lms 1 alone were lower than the combo Lms 1 + Bz 10 (**figure 3A**), and also remarkable increases in IL-6 levels, even higher than the infected not treated group (**figure 3D**).

Subsequently, to further explore the effect of Lms + Bz combo but using lower doses of this thiazole, Lms 0.5 + Bz 10 was assayed and found to promote a decrease around 60 % of parasitemia peak in comparison to the infected not treated group and gave a mild protection (60 % animal survival) against mortality up to 30 dpi. In parallel, Bz 100 mpk (its optimal dose) completely suppressed parasitemia during the five days of treatment and promoted 100 % animal survival until 30 dpi (**figure 4A and B**). Regarding the blood analysis by qPCR, this technique demonstrated that in the surviving mice, Lms 0.5 + Bz 10 was more effective (around 5.5-fold; $P = 0,036$) to reduce the parasite load in blood than Bz given at its optimal dose (100 mpk) (**figure 4C**).

4. Discussion

To our knowledge, Lms started as antihelminthic drug in the early 1960s, and has been tested as immunotropic agent since 1970s (Amery and Bruynseels 1992). It has been clinically assayed, for instance, as adjuvant therapy in the treatment of colon rectal cancer, being later on encouraged for the practical use due to its positive

outcome (Mutch and Hutson 1991). Also, against protozoa it demonstrated beneficial effects in patients with chronic cutaneous leishmaniasis (Butler 1982), as well as in experimental visceral leishmaniasis either used in monotherapy or combination (Rezai et al 1988; Rifaat et al 1989). In mice experimentally infected with *Toxoplasma gondii*, Lms co-administered with the combo sulfadiazine plus pyrimethamine showed an immunopotentiator effect, promoting life span of the treated mice in comparison to non-treated or treated with combo without Lms (Köksal et al 2016).

The urge needs of alternative treatments against Chagas disease directed us to revisit these results. Using updated techniques and validated models of *T. cruzi* mice acute infection, hence to assess the potential antiparasitic and immunomodulatory activities of Lms with different therapeutic protocols and contemplate the possibility of repositioning alone or in co-administration.

Thus, to validate the protocols, a standard treatment with Bz in optimal and suboptimal doses was characterized concerning parasitemia and inflammatory profile and compared to not infected and infected not treated control groups on the same parameters. Bz 100 showed, as usual, efficient antiparasitic activity, not observed with Bz 10, as demonstrated previously by our group (Simões-Silva et al 2017). The parasitemia suppression obtained with Bz 100 could be related to a regulated inflammatory profile in relation to the highly pro-inflammatory environment existent in infected not treated animals, once the levels of parasite in the organism causing damage, during the acute phase, is strikingly reduced. Curiously, Bz 10 displays equivalent inflammatory regulation, that is not correlated to parasitemia reduction, as in the case of Bz 100 treatment. This observation dissociates the reduction of parasite load from the activation of pro- and anti-inflammatory cytokines, corroborating previous findings that the effectiveness of Bz treatment on acute *T. cruzi* infection is built upon the trypanocidal effect and the cooperation with the host's immune system (Ferraz et al. 2007).

Lms has been reported to act as antiparasitic and immunomodulatory agent. The distinct mode of action is obtained with different doses that range from 7.5 to 1.8 mpk (Risvanli and Aydin 2003). However, some aspects are very important to achieve one outcome, naming appropriate timing of the treatment, careful dosing, and the immune status of the host. The use of Lms must always be primarily indispensably evaluated in healthy models or individuals, speaking respectively of pre-clinical and clinical trials, aiming to avoid disadvantageous scenarios (Brunner and Muscoplat 1980). Similar side effects as we observed have been reported for people that used

Lms-adulterated cocaine in United States (Fredericks et al 2017). Deleterious effect of Lms was formerly described on experimental African trypanosomiasis in different mice strains, increasing mortality in more susceptible animals (Libeau and Pinder 1981). Renoux (1980) addressed general issues of the immunopharmacology of Lms, stating that since it can act as an immunostimulant or immunosuppressive agent, diverse outcomes could be expected according to one's methodologies (meaning experimental assays, timing of drug administration, amount of drug exposure and model of disease), and these are mostly not reproducible among groups, or even in the same laboratory.

Former studies on *T. cruzi* experimental infection (Y strain, Swiss Webster mice) showed that a 10-day prophylactic treatment with Lms reduced parasitemia to less than 50 % of the levels observed in infected not treated mice, decreasing also death rate to 10 %, while a therapeutic subcutaneous alternate administration for the first 10 days after infection did not interfere in parasitemia levels comparing to infected not treated, presenting similar mortality (Abath et al 1988). In our studies, the administration of a single dose of Lms previously to the infection, then followed by 5-day treatment did not provide reduction on the parasitemia levels. In all the groups, there was parasitemia exacerbation, and the pre-infection single dose of Lms did not cause any influence in the result, when comparing to the groups without pre-treatment (data not shown).

Lms tested in monotherapy using therapeutic protocols (starting at the 5 dpi, that corresponds to the parasitemia onset in this experimental models) demonstrated that the drug was not able to reduce parasitemia with any of the doses administered (10, 5 and 1 mpk, neither i.p. nor p.o.) that comprised the range described in literature from antiparasitic to immunomodulatory action (Risvanli and Aydin 2003). In fact, the treatment increased parasitemia (13 - 146 %) in comparison to the infected not treated control group (data not shown). Parasitemia increase was also described for mice infected with *T. (nanomonas) congolense* treated with Lms (Libeau and Pinder 1981).

Additionally, co-administration protocols were also performed, using the suboptimal dose of Bz (10 mpk) and different doses of Lms. Among the combos assayed, Lms 1 + Bz 10 decreased around 30 % of parasitemia in relation to the infected not treated control group. This combo was even more effective than the respective monotherapies Lms 1 and Bz 10. Cytokine analysis showed that Lms 1 and Bz 10 similarly reduced the levels of the studied mediators (IFN- γ , IL-6, TNF and IL-10), presenting lower levels than infected not treated group. The combo Lms 1 + Bz 10 induced a highly inflammatory profile associated with significantly increased levels

of IFN- γ and IL-6 in comparison to all other studied groups. Mice strain that are susceptible or resistant to *T. cruzi* show elevated production of IFN- γ during acute infection (Morato et al 1998; Nabors and Tarleton 1991), and it was also observed here. The combined treatment increased IFN- γ production in comparison to the monotherapies that may suggest an immune response interaction between Lms and Bz at the above defined doses. However, the bulk of the results show that the combo does not represent a promising anti-parasitic and immunomodulatory alternative for future therapeutic approaches for CD as it does not fully protect against mice mortality and only partially decreases the parasite load measured by light microscopy and qPCR.

Regarding IL-6 expression, it is elevated in parasitized tissues and in the circulation of experimental animals, as well as in humans (Chandrasekar et al 1996; Truysens et al 1994). IL-6 plays an important role in mediating resistance against the parasite in murine model, showing that it can influence also the antigen specific T-cell differentiation, and might be even correlated to the kinetics of IFN- γ expression (Gao and Pereira 2002). IL-6 does not reduce parasite levels, and its transitory higher expression during early infection may prolong animal survival (Truysens et al 1994).

Parasitemia suppression (60 % animal survival) was also achieved using combo Lms 0.5 + Bz 10, even though a mild protection against mortality was obtained. Also, the surviving animals from this combo displayed lower blood parasite load measured by qPCR than Bz at the optimal dose (100 mg/kg/day) that completely suppressed the parasitemia peak (by light microscopy readout) and fully protected against mortality. The lower qPCR levels in the mice group treated with the combo in comparison to the standard Bz 100 may be related to modulation of the mice immune response leading to the clearance of residual parasite nests. This result might indicate that the lower the dose of Lms, the better the combo antiparasitic effect is, but this hypothesis needs to be further verified by additional future studies using molecular analysis as well as cytokine measurements.

Our results show the importance of conducting pre-clinical trials with drug candidates for repositioning and in combination, once they can be beneficial or harmful to the host and, in a wider scale, to the patient. Careful attention must be paid to drug interactions that could have surprising outcomes in face of an altered immune status of the host. Fundamentally, we must consider that individuals infected with *T. cruzi* mostly are diagnosed in a later chronic phase, when they are older adults that require

other medications for comorbidities related or not to CD, and treatment must be mindfully addressed to avoid unwanted consequences.

5. Acknowledgements

We would like to thank MSc. Julianna Siciliano, MSc. Ludmila Fiuza, Ivana Melo and Patrícia Bernardino for technical support. We also thank the Rede de Plataformas Fiocruz (PDTIS-Fiocruz) for the facilities on the real-time PCR RPT09A platform and RPT11G.

6. Financial support

The fundings were provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), PAEF and Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). MNCS, OCM and CB are CNPq fellows and Cientista do Nosso Estado CNE FAPERJ.

Conflicts of Interest: none.

7. References

- Abath, FG, Coutinho, EM, Montenegro, SM, Gomes, YM, Carvalho, AB** (1988) The use of non-specific immunopotentiators in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **82**(1):73-6.
- Amery, WK and Bruynseels, JP** (1992) Levamisole, the story and the lessons. *International Journal of Immunopharmacology* **14**(3):481-6.
- Brener, Z** (1962) Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **4**:386–396.
- Brunner, CJ and Muscoplat, CC** (1980) Immunomodulatory effects of levamisole. *Journal of the American Veterinary Medical Association* **176**(10 Spec No):1159-62.
- Butler, PG** (1982) Levamisole and immune response phenomena in cutaneous leishmaniasis. *Journal of the American Academy of Dermatology* **6**(6):1070-7.
- Chandrasekar, B, Melby, PC, Troyer, DA, Freeman, GL** (1996) Induction of proinflammatory cytokine expression in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **223**, 365–71.
- Coura, JR** (2009) Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**(4):549-54.
- Duffy, T, Cura, CI, Ramirez, JC, Abate, T, Cayo, NM, Parrado, R, Bello, ZD, Velazquez, E, Muñoz-Calderon, A, Juiz, NA, Basile, J, Garcia, L, Riarte, A, Nasser, JR, Ocampo, SB, Yadon, ZE, Torrico, F, de Noya, BA, Ribeiro, I, Schijman, AG** (2013) Analytical performance of a multiplex real-time PCR assay using TaqMan probes for quantification of *Trypanosoma cruzi* satellite DNA in blood samples. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **7**:e2000.
- Filardi, LS and Brener, Z** (1987) Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**(5):755-9.
- Fredericks, C, Yon, JR, Alex, G, Morton, M, Messer, T, Bokhari, F, Poulakidas, S** (2017) Levamisole-induced Necrosis Syndrome: Presentation and Management. *Wounds* **29**(3):71-76.
- Gao, W and Pereira, MA** (2002) Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Parasitology* **32**(2):167-70.
- Guedes-da-Silva, FH, Batista, DG, Da Silva, CF, De Araújo, JS, Pavão, BP, Simões-Silva, MR, Batista, MM, Demarque, KC, Moreira, OC, Britto, C,**

- Lepesheva, GI, Soeiro, MN** (2017) Antitrypanosomal activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VFV in the Swiss mouse models of Chagas disease induced by the *Trypanosoma cruzi* Y strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **61**(4), pii:e02098-16.
- Köksal, ZŞ, Yanik, K, Bilgin, K, Yılmaz, EM, Hokelek, M** (2016) *In Vivo* Efficacy of Drugs against *Toxoplasma gondii* Combined with Immunomodulators. *Japanese Journal of Infectious Diseases* **69**(2):113-7.
- Libeau, G and Pinder, M** (1981) Deleterious effect of levamisole on experimental trypanosomiasis in mice. *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux* **34**(4):399-404. [Article in French]
- Lionel, ND, Mirando, EH, Nanayakkara, JC, Soysa, PE** (1969) Levamisole in the treatment of ascariasis in children. *British Medical Journal* **4**(5679):340-1.
- Maude, RJ, Silamut, K, Plewes, K, Charunwatthana, P, Ho, M, Abul Faiz, M, Rahman, R, Hossain, MA, Hassan, MU, Bin Yunus, E, Hoque, G, Islam, F, Ghose, A, Hanson, J, Schlatter, J, Lacey, R, Eastaugh, A, Tarning, J, Lee, SJ, White, NJ, Chotivanich, K, Day, NP, Dondorp, AM** (2014) Randomized controlled trial of levamisole hydrochloride as adjunctive therapy in severe falciparum malaria with high parasitemia. *Journal of Infectious Diseases* **209**(1):120-9.
- Menna-Barreto, RF and de Castro, SL** (2017) Clear Shot at Primary Aim: Susceptibility of *Trypanosoma cruzi* Organelles, Structures and Molecular Targets to Drug Treatment. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **17**(10):1212-1234.
- Morato MJ, Colley DG, Powell MR** (1998) Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **31**(1):123-5.
- Moreira, OC, Ramírez, JD, Velázquez, E, Melo, MF, Lima-Ferreira, C, Guhl, F, Sosa-Estani, S, Marin-Neto, JA, Morillo, CA, Britto, C** (2013) Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. *Acta Tropica* **125**:23–31.
- Morillo, CA, Waskin, H, Sosa-Estani, S, Del Carmen Bangher, M, Cuneo, C, et al; on behalf of the STOP-CHAGAS Investigators** (2017) Benznidazole and posaconazole in eliminating parasites in asymptomatic *T. cruzi* carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *Journal of the American College of Cardiology* **69**(8):939-947.
- Mutch, RS and Hutson, PR** (1991) Levamisole in the adjuvant treatment of colon cancer. *Clinical Pharmacology* **10**(2):95-109.

- Nabors, GS and Tarleton, RL** (1991) Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology* **146**, 3591–3598.
- Prata, A** (2001) Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet Infectious Diseases* **1**(2):92-100.
- Rassi, AJ, Rassi, A and Marin-Neto, A** (2010) Chagas disease. *The Lancet* **375**:1388–1402.
- Rezai, HR, Behbehani, AB, Gettner, S, Ardehali, S** (1988) Effect of levamisole on the course of experimental leishmaniasis in guinea-pigs and mice: haematological and immunological findings. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **82**(3):243-9.
- Renoux, G** (1980) The general immunopharmacology of levamisole. *Drugs* **20**(2):89-99.
- Rifaat, LK, Mohammad, MA and Jawdat, SZ** (1989) Ivermectin, levamisole and thymic extract for chemotherapy and immunostimulation of visceral leishmaniasis in hamsters and mice. *Japanese Journal of Medical Science and Biology* **42**(2):51-61.
- Risvanli, A and Aydin, M** (2003) The effects of levamisole on the pregnancy rate, average litter size, sexuality, living rate and lactation period in rats. *Firat University Journal of Health Sciences (Turkey)* **17**:45-7.
- Scarim, CB, Jornada, DH, Chelucci, RC, de Almeida, L, Dos Santos, JL, Chung, MC** (2018) Current advances in drug discovery for Chagas disease. *European Journal of Medicinal Chemistry* **155**:824-838.
- Scherb, J** (1969) Therapeutic efficiency of Levamisole in human ascariasis. *Hospital (Rio J)* **76**(3):1067-70. [Article in Portuguese]
- Simões-Silva, MR, De Araújo, JS, Oliveira, GM, Demarque, KC, Peres, RB, D'Almeida-Melo, I, Batista, DGJ, Da Silva, CF, Cardoso-Santos, C, Da Silva, PB, Batista, MM, Bahia, MT, Soeiro, MNC** (2017) Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *In vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy. *Biochemical Pharmacology* **145**:46-53.
- Torrice, F, Gascon, J, Ortiz, L, Alonso-Vega, C, Pinazo, MJ, Schijman, A, Almeida, IC, 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 Infectious Diseases* **18**(4):419-430.

Truyens, C, Angelo-Barrios, A, Torrico, F, Van Damme, J, Heremans, H, Carlier, Y (1994) Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses. *Infectious Immunology* **62**, 692–6.

LEGEND OF FIGURES

Figure 1: Blood parasitemia (**A**) and cumulative mortality (**B**) of male Swiss Webster mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) not treated, treated with optimal (Bz 100 mpk) and suboptimal (Bz 10 mpk) doses of benznidazole or co-administration of levamisole and benznidazole (Lms 1 mpk + Bz 10 mpk) for five days during the acute phase of the experimental Chagas disease.

Figure 2: Cytokine expression levels in blood of male Swiss Webster mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) on the 2nd and 30th day post treatment (corresponding to 6th and 40th day post infection, respectively) with optimal (Bz 100mpk) and suboptimal (Bz 10mpk) doses of benznidazole, in comparison with not treated and uninfected/not treated mice. The levels of IFN- γ (**A**), IL-10 (**B**), TNF (**C**) and IL-6 (**D**) were determined by flow cytometry.

Figure 3: Cytokine expression in blood of male Swiss Webster mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) on the 30th day post treatment (corresponding to 40 dpi) with suboptimal dose of benznidazole (Bz 10 mpk), levamisole (Lms 1mpk) and co-administration (Lms 1 mpk + Bz 10 mpk), in comparison with not treated and uninfected/not treated mice. The levels of IFN (**A**), IL-10 (**B**), TNF (**C**) and IL-6 (**D**) were determined by flow cytometry. Statistically significant differences (*, ** and ***) were $p < 0.05$.

Figure 4: Blood parasitemia analysis by light microscopy (**A**), mortality rates (**B**) and blood parasite load quantified by qPCR obtained on the 30th day post treatment (**C**) of Swiss Webster mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) treated with benznidazole 100 mpk and levamisole 0.5 mpk co-administered with benznidazole 10 mpk for five days during the acute phase of the experimental Chagas disease.

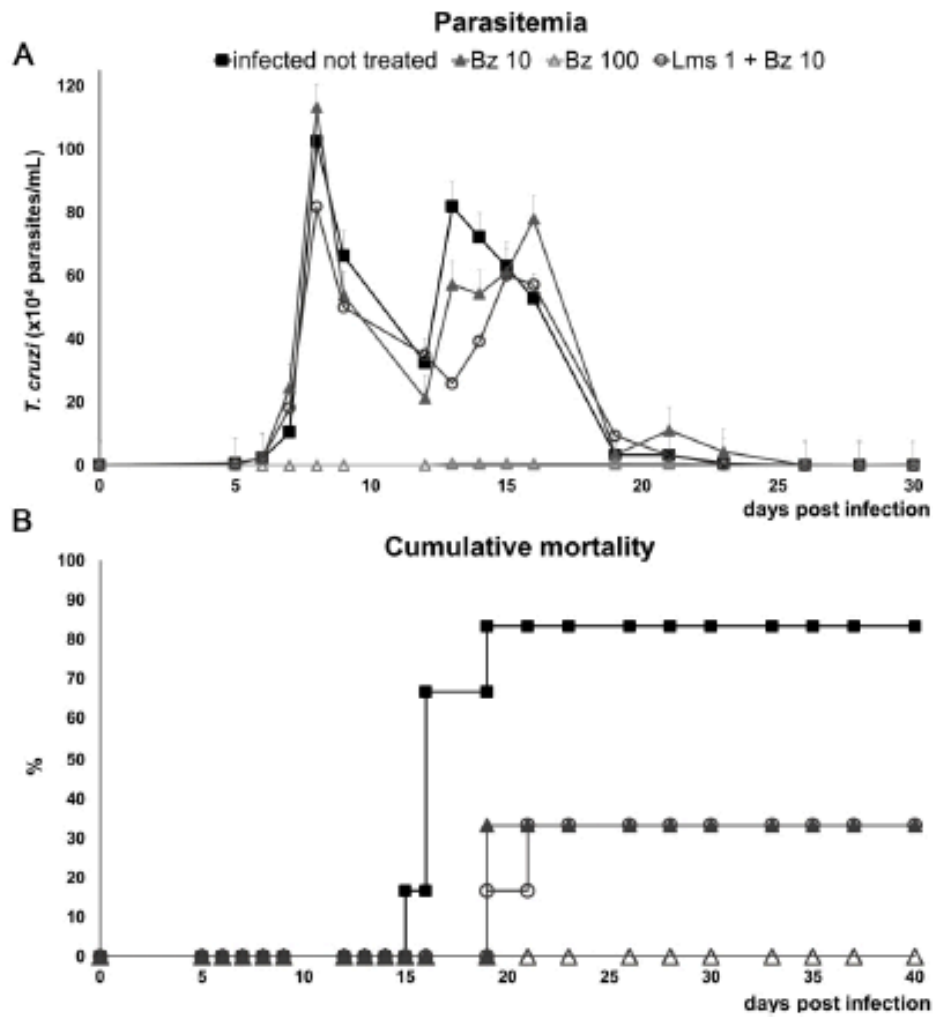


Figure 1: Blood parasitemia (A) and cumulative mortality (B) of male Swiss Webster mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) not treated, treated with optimal (Bz 100 mpk) and suboptimal (Bz 10 mpk) doses of benznidazole or co-administration of levamisole and benznidazole (Lms 1 mpk + Bz 10 mpk) for five days during the acute phase of the experimental Chagas disease.

204x209mm (300 x 300 DPI)

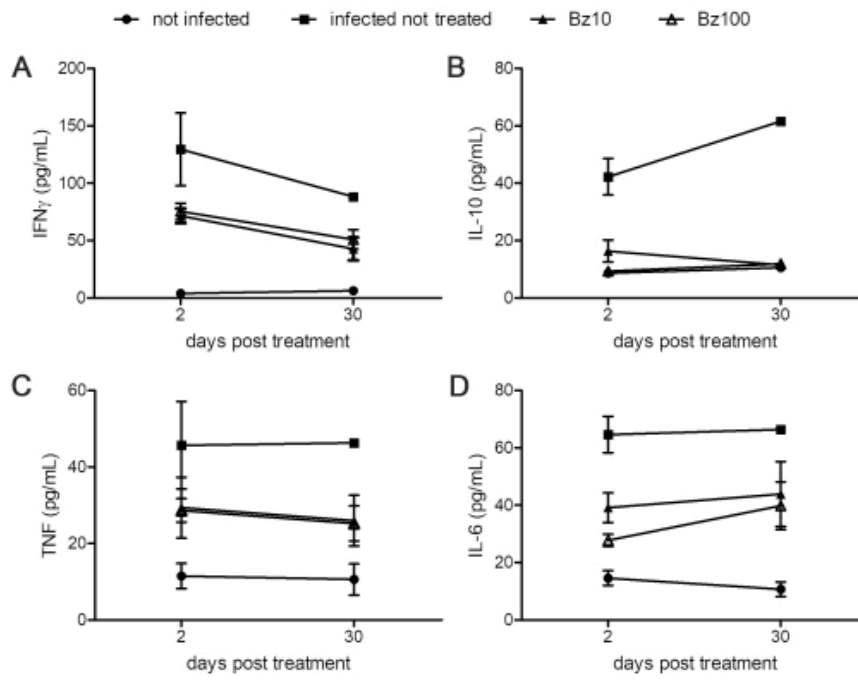


Figure 2: Cytokine expression levels in blood of male Swiss Webster mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) on the 2nd and 30th day post treatment (corresponding to 6th and 40th day post infection, respectively) with optimal (Bz 100mpk) and suboptimal (Bz 10mpk) doses of benznidazole, in comparison with not treated and uninfected/not treated mice. The levels of IFN- γ (A), IL-10 (B), TNF (C) and IL-6 (D) were determined by flow cytometry.

217x165mm (300 x 300 DPI)

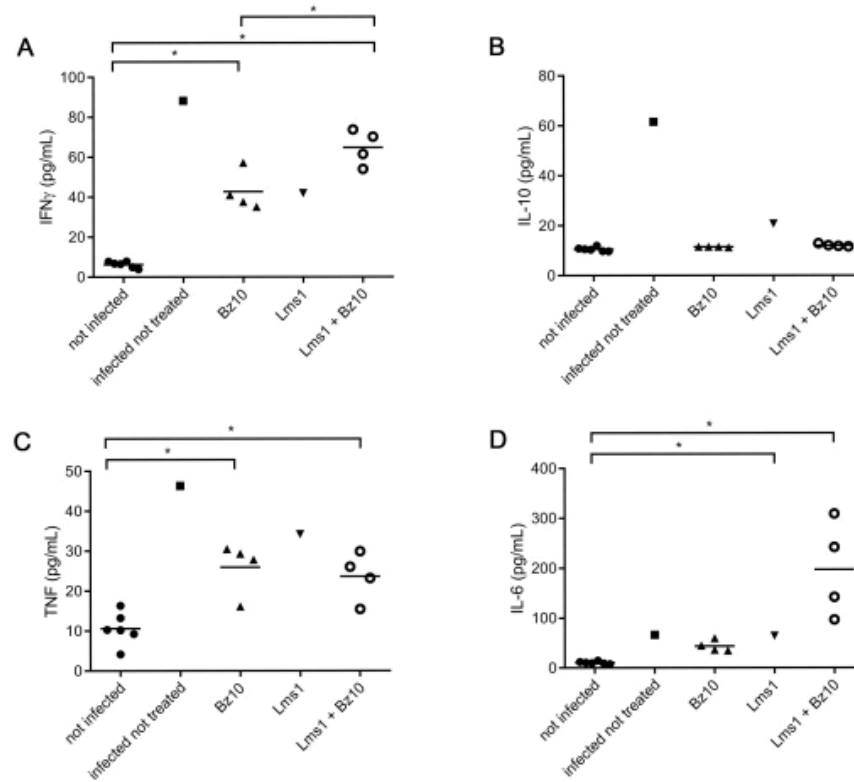


Figure 3: cytokine expression in blood of male Swiss Webster mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) on the 30th day post treatment (corresponding to 40 dpi) with suboptimal dose of benznidazole (Bz 10 mpk), levamisole (Lms 1mpk) and co-administration (Lms 1 mpk + Bz 10 mpk), in comparison with not treated and uninfected/not treated mice. The levels of IFN (A), IL-10 (B), TNF (C) and IL-6 (D) were determined by flow cytometry. Statistically significant differences (*, ** and ***) were $p < 0.05$.

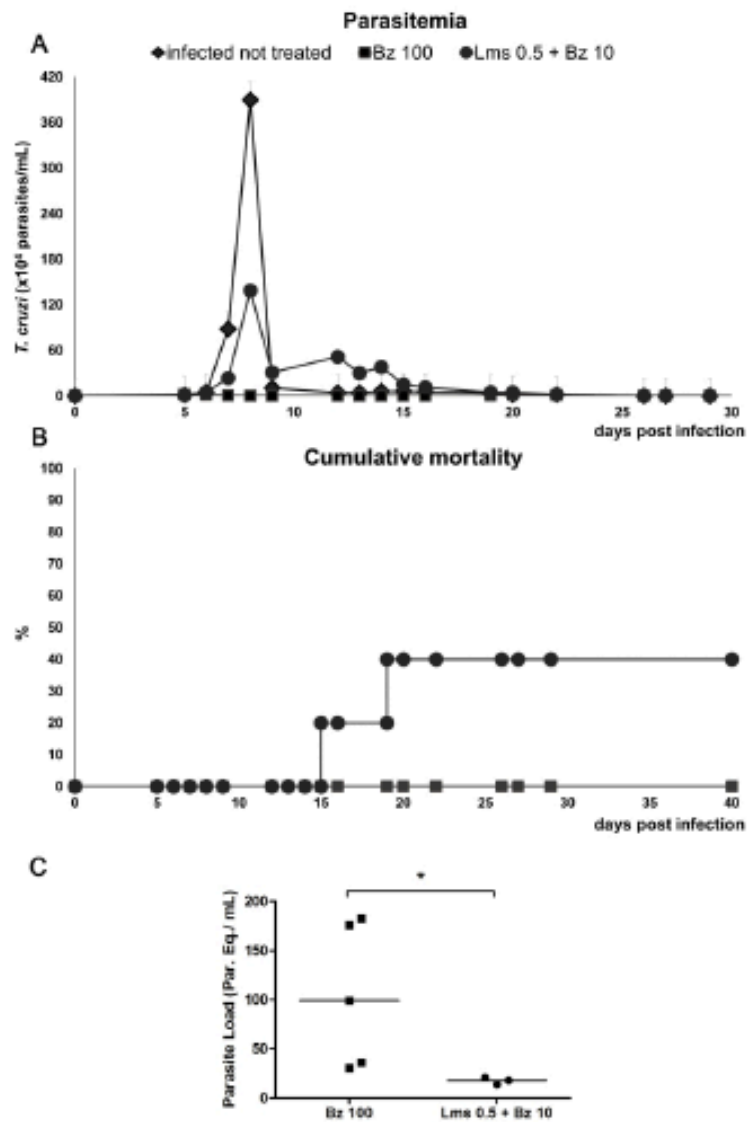


Figure 4: Blood parasitemia analysis by light microscopy (A), mortality rates (B) and blood parasite load quantified by qPCR obtained on the 30th day post treatment (C) of Swiss Webster mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) treated with benznidazole 100 mpk and levamisole 0.5 mpk co-administered with benznidazole 10 mpk for five days during the acute phase of the experimental Chagas disease.

3.4 Artigo 4 (a ser submetido)

“Phenotypic Screening of lipid biosynthesis inhibitors against *Trypanosoma cruzi*, and the administration of the combo tomatidine with posaconazole *in vitro* and *in vivo*”

Triagem fenotípica de inibidores da biossíntese de lipídios contra *Trypanosoma cruzi*, e a administração da combinação tomatidina e posaconazole *in vitro* e *in vivo*

Inibidores da biossíntese de lipídios têm sido investigados como promissores agentes tripanocidas, uma vez que podem interferir em aspecto metabólico vital do parasita. O problema de tais moléculas reside em sua seletividade em relação à célula mamífera hospedeira. Este trabalho investigou potenciais fármacos contra *T. cruzi* e o *hit* identificado, cloridrato de tomatidina, foi combinado a posaconazol para tratamento de camundongos em fase aguda da doença de Chagas experimental.

Phenotypic Screening of lipid biosynthesis inhibitors against *Trypanosoma cruzi*, and the administration of the combo tomatidine with posaconazole *in vitro* and *in vivo*

Marianne Rocha Simões-Silva¹, Gabriel de Melo Oliveira¹, Jerônimo Diego de Souza Campos¹, Aline Nefertiti da Gama¹, Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza¹, Karine Lima da Costa¹, Anna Frieda Fesser², Monica Cal², Romina Rocchetti², Raiza Brandão Peres¹, Marcos Meuser Batista¹, Kelly Cristina Demarque¹, Xue Li Guan³, Marcel Kaiser², Pascal Mäser², Maria de Nazaré Correia Soeiro^{1*}

¹ Laboratório de Biologia Celular, Pavilhão Cardoso Fontes, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Parasite Chemotherapy Unit, Swiss Tropical and Public Health Institute, Socinstrasse 55a, 4051 Basel, Switzerland.

³ Systems Biology of Lipid Metabolism in Human Health and Diseases Laboratory, Lee Kong Chian school of Medicine, Novena Campus, 11 Mandalay Road, 308232, Singapore

* *Corresponding author.* Maria de Nazaré Correia Soeiro, Laboratório de Biologia Celular, Pavilhão Cardoso Fontes, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. Telephone: +552125621368. E-mail address: soeiro@ioc.fiocruz.br.

ABSTRACT

15 inhibitors of lipid biosynthesis were phenotypically screened for their activity on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease, and compared to the reference drug benznidazole (Bz). First, they were assayed on epimastigotes, replicative forms of the parasite found in the Triatominae vector. Six out of 15 inhibitors displayed $IC_{50} < 50 \mu\text{g/mL}$, being the sphingosine analogue FTY720 the most active ($2.4 \mu\text{g/mL}$). Next, the same compounds were tested on intracellular amastigotes that are relevant for human infection and found that four out of 15 presented similar potency as Bz, with IC_{50} values $\leq 1 \mu\text{g/mL}$. However, high toxicity to mammalian host cells was also observed and the only molecules with selectivity indexes (SI) > 10 were Ro48-8071 (SI = 13.7) and tomatidine hydrochloride (TH) (SI = 41.2). Both were then chosen to combinatory assays, on the same intracellular amastigote protocols, using fixed-ratio proportion combos with Bz, as well as with two others highly trypanosomicidal agents, posaconazole (Posa) and fexinidazole. The ΣFICI revealed that all the combos with Ro48-8071 were additive or antagonist while TH was synergistic with Posa (mean $\Sigma\text{FICI} = 0.2$) and additive with the others. Following *in vivo* assays (acute experimental *T. cruzi* mice infection) demonstrated lack of antiparasitic activity of TH alone in doses ranging from 0.5 to 5 mg/Kg, while Posa 1.25 and 10 mg/Kg partially (80 %) and completely (> 99 %) suppressed parasitemia, respectively, and the higher dose reached 40 % of survival; all untreated mice died. Partial parasitemia reduction (> 60 %) and protection against mortality (> 40 %) was observed in co-administration of THs + Posa 1.25 mg/Kg, being the ratio 1Posa:3TH the best combo (80 and 60 % of parasitemia decrease and animal survival, respectively). More studies are needed to further explore the combo TH + Posa.

Key words: Chagas disease, tomatidine hydrochloride, lipid biosynthesis inhibitors, drug combination

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is a protozoa that causes Chagas disease (CD) (Rassi et al 2010). It is endemic from south United States to south of Argentina, corresponding to the occurrence of the Triatomine vector (Zingales et al 2012). Nowadays it has spread to other continents due to increasing global migration through a diversity of transmission routes (in this case particularly blood transfusions, organ transplantation, and mother-to-child) (Gascon et al 2010). Oral transmission due to the ingestion of contaminated beverages with the feces of infected triatomines is being reported in endemic areas such as Brazil (Coura et al 2014). The disease has an acute phase in which few infected individuals demonstrate a flu-like clinical condition, while the majority has no symptom at all (Prata 2001; Rassi et al 2010). After, the patients enter a chronic phase that is indeterminate in around 70 - 80 % of cases, characterizing a silent illness only diagnosed through specific serology, whilst the other 20 – 30 % develop cardiac and/or digestive disease (Prata 2001; Rassi et al 2010).

Treatment of CD is currently done with benznidazole (Bz) or nifurtimox, both far from ideal, once they present lack of efficacy in later chronic phase, there are naturally resistant parasite strains, and severe side effects hinder patient adhesion (Castro et al 1988; Chatelain 2016). Many strategies are used in the search for new alternative therapies, among them drug repurposing and combination (Coura 2009). The identification of targets in *T. cruzi* that are common to other pathogens enables the investigation of compound repositioning, including those involved in lipid biosynthesis in fungi (Menna-Barreto and De Castro 2017). Thus, well-established ergosterol biosynthesis inhibitors (EBI) in use for systemic fungal diseases, such as the posaconazole (Posa) and E1224, have been assayed for CD. Unfortunately, they showed therapeutic failure in recent clinical trials and many hypotheses were raised including their poor PK characteristic (Morillo et al 2017; Torrico et al 2018). However, due to their usual great potency upon the highly multiplicative forms of *T. cruzi*, EBIs future screenings and applications just cannot be discarded and new approaches must be scrutinized, naming the co-administration with other compounds (Fügi et al 2015). Drug combination allows the therapy to tackle more than one target simultaneously, reducing doses and time of administration. This strategy thus attempts to avoid drug resistance and to increase efficacy and selectivity (Sun et al 2016).

In the present work, the antiparasitic activity of 15 inhibitors of lipid biosynthesis was investigated against multiplicative forms of *T. cruzi* for the determination of hit

compounds to be further combined to drugs active on the parasite, and later on, the synergistic combos assayed in murine models of acute infection.

MATERIALS AND METHODS

Drugs

Amitryptiline (hydrochloride), FTY720, FTY720 phosphate, AMP-deoxynojirimicin, D609 (potassium salt), fumonisin B1, myriocin, Ro48-8071, TMP-153, GW4869 (hydrochloride hydrate), PDMP (hydrochloride), bezafibrate, quinuclidine hydrochloride, 3-aminoquinuclidine dihydrochloride, tomatidine hydrochloride (TH), fexinidazole (Fexi) and posaconazole (Posa) were all purchased from Sigma-Aldrich (Belgium). Benznidazole (Bz) was purchased from Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (Brazil). For *in vitro* tests, stock solutions of 100 µg/mL of each compound were prepared in DMSO, never exceeding 0.6 % as final concentration which does not induce cellular damages to mammalian cells and parasites (Simões-Silva et al., 2016). For *in vivo*, Bz, Posa and TH were prepared for oral (p.o.) administration in extemporaneous solutions. Bz was diluted in distilled water with 3 % Tween 80 (Sigma-Aldrich, Belgium), Posa and TH in aqueous solution of 0.5 % carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich, Belgium). Each treated animal received p.o. 100 µL of a solution according to the experimental group.

Mammalian cells and parasite for *in vitro* assays

L6 cell lines derived from rat skeletal myoblast (ATCC CRL-1458) were used as host cells for *T. cruzi* infection using trypomastigotes of Tulahuen C2C4 strain (DTU VI) expressing the β -galactosidase gene (LacZ) (Buckner et al 1996). The cultures were sustained in RPMI-1640 supplemented with 10 % inactivated fetal bovine serum (FBS) and 2 µM L-glutamine at 5% CO₂ and 37 °C. Epimastigotes (STIB 980 strain) were cultivated at 28 °C in LIT medium supplemented with hemin (2 µg/mL) and 10 % FBS. The epimastigotes were used in log phase of growth. Y strain (DTU II) bloodstream trypomastigotes isolated from Swiss Webster mice infected at the peak of parasitaemia were used for the inoculum of *in vivo* studies (Meirelles et al 1984).

Activity on *T. cruzi* epimastigotes

Epimastigotes (10^7 parasites/mL) in supplemented LIT medium were treated with serially diluted 1:3 compound concentrations (starting at 100 $\mu\text{g/mL}$) and incubated for 69 h. Viability was evaluated by the observation of morphology and motility in comparison to not treated parasites before the colorimetric assay. 10 μL of Alamar Blue (containing 12.5 mg resazurin dissolved in 1000 mL distilled water) were then added to each well and incubation continued for a further 2 - 4 h. Afterwards the plate was read in Spectramax Gemini XS microplate fluorometer (Molecular Devices Cooperation, USA) using wavelengths of 536 nm (excitation) and 588 nm (emission) (Ráz et al 1997). The graphic program Softmax Pro (Molecular Devices) was used to transfer the data into and further calculate IC_{50} values.

Activity on *T. cruzi* intracellular amastigotes

Rat skeletal myoblasts (L6 cell lines) were seeded in 96-well plates at 10^4 cells/well in 100 μL RPMI 1640 medium with 10 % FBS and 2 mM L-glutamine. The medium was removed after 24 h incubation and replaced by 100 μL new medium containing 10^5 Lac-Z trypomastigotes. 48 h later, the medium was again removed and replaced by 100 μL fresh medium with or without a serial drug dilution of seven 3-fold dilution steps covering a range from 100 to 0.05 $\mu\text{g/mL}$. Treatment was followed by 96 h of incubation, then the plates were inspected to check sterility and normal growth of the controls under an inverted microscope. CPRG/Nonidet (50 μL) substrate was added to all wells and a color reaction was developed within the next 2 - 6 h and read at 540 nm in Spectramax Gemini XS microplate fluorometer (Molecular Devices Cooperation, USA). The graphic program Softmax Pro (Molecular Devices) was used to transfer the data into and further calculate IC_{50} values. Benznidazole was used as reference drug.

Citotoxicity against L6 cell lines

Using 96-well plates, 4×10^4 L6 cells were plated per well in 100 μL RPMI 1640 medium with 10 % FBS and 2 mM L-glutamine. Serial drug dilution of seven 3-fold dilution steps covering a range from 100 to 0.05 $\mu\text{g/mL}$ were prepared. After 96 h of incubation, the plates were analyzed under an inverted microscope to assure growth of the controls and sterile conditions. Alamar Blue solution was then added to each well (10 μL) and the plates incubated for another 2 h. Spectramax Gemini XS microplate fluorometer was used to read the plates (excitation wavelength of 536 nm and an emission

wavelength of 588 nm). The graphic program Softmax Pro (Molecular Devices) was used as above reported.

Drug combination

In vitro drug interactions were determined using a fixed-ratio method. Dose response experiments were performed using TH or Ro48-8071 with Bz, Posa or Fexinidazole (Fexi) at 1:3, 1:1 and 3:1 fixed-ratios for L6 cell cultures infected with Lac-Z *T. cruzi*, according to the same protocol above described. Fractional inhibitory concentrations indexes (FICIs) and the sum of FICIs (Σ FICIs) were calculated as follows: FICI of one compound = IC_{50} of this compound in combination / IC_{50} of the same compound in monotherapy. The same equation was applied to the respective partner drug. The Σ FICIs = FICI_{Compound} + FICI_{Partner drug}. An overall Σ FICIs was determined and used to classify the nature of each interaction. Isobolograms were built by plotting the IC_{50} of compound 1 against the IC_{50} of compound 2 (Diniz et al 2013). Σ FICIs \leq 0.5 = synergism; $0.5 < \Sigma$ FICIs \leq 4.0 = additive (no interaction); Σ FICIs $>$ 4.0 = antagonism.

Animals

Female (18 - 23 g) and male (11 - 13 g) Swiss Webster mice obtained from the Instituto de Ci4ncia e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil) were housed in cages with sterilized water and chow *ad libitum*, in a conventional room under a 12 h/12 h light/dark cycle at 20 to 24°C. Groups had maximum of five animals. All procedures were carried out according to the guidelines of Fiocruz Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA L-38/17).

Mouse acute toxicity

Female mice (n = 2 per group) received p.o. increasing doses of TH up to 200 mg/kg of body weight (mpk) and compared to mice that received drug-vehicle (CMC aqueous solution described above) in parallel. Toxic and sub-toxic symptoms were inspected to determine the no-observed-adverse-effect level (NOAEL) according to the guidelines of the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). After 48 h of drug or vehicle administration, the mice were euthanized for blood collection and hematological analyses were provided by the ICTB/Fiocruz (Sim4oes-Silva et al 2017).

Mice infection

Male mice (n = 5 per assay, 2 assays) were infected i.p. with 10^4 blood trypomastigotes of *T. cruzi* Y strain. Only mice with positive parasitemia at day 5 post infection (dpi) were used to compose the treated and not treated groups.

Efficacy studies

T. cruzi- infected mice were treated p.o. for ten days, from 5 to 14 dpi. The groups received Posa, TH and combo Posa + TH in different concentrations. Posa was used as control treatment at 10 and 1.25 mpk. TH was used in a dose range from 5 - 0.5 mpk, either alone or in combo with Posa 1.25 mpk.

Parasitemia, mortality rates and endpoint

Since 5 dpi until the 30th day post treatment (dpt), daily parasitemia was individually assessed by fresh blood sampling (5 μ L) as reported (Brener 1962). Mortality was daily checked, and death rate expressed as cumulative mortality (% CM) (Simões-Silva et al 2017). Surviving animals were euthanized for blood and heart collection on the 30 dpt.

Statistical analysis

The statistical analysis was done individually for each assay ANOVA test.

RESULTS

The compounds were screened for their anti-*T. cruzi* activity on epimastigotes (strain STIB 980) and intracellular amastigotes (Tulahuen C2C4 strain expressing the β -galactosidase gene – LacZ), as well as for their cytotoxicity on mammalian cells (**table 1**). Except for six compounds that presented IC₅₀ values < 50 μ g/mL, several were not active on epimastigotes (**table 1**). While tested upon intracellular amastigotes, four compounds (FTY720, RO48-8071, TH and TMP-153) were potent

as Bz (0.7 µg/mL) (**table 1**). Unfortunately, most of them showed relevant toxicity towards mammalian host cells, thus corresponding to very low selectivity indexes (SI) (**table 1**). The best active and selective compounds on intracellular amastigotes were only Ro48-8071 and TH, with the highest SI among all tested here (respectively 13.7 and 41.2) (**table 1**).

Ro48-8071 and TH were, then, directed to *in vitro* combination assays with Bz, Posa and Fexi (**table 2**). There was mostly additivity among the interactions, but Ro48-8071 frequently showed antagonism, no matter the drug it was co-administered with (**table 2**). In contrast, the combination of TH with Posa mainly presented synergism (mean Σ FICI = 0.2) which led the efforts towards *in vivo* studies.

In the acute *T. cruzi* infection murine assay, the combo TH + Posa was tested and compared to the respective non-toxic doses of the monotherapies (**figures 1 and 2**). Posa 10 mpk suppresses parasitemia on the peak (8 dpi), but around 40 % of the animals died until the endpoint (30 dpt) (**figure 1**). Posa 1.25 was not as potent as the other dose, once it causes partial suppression of parasitemia (80 %) but provide less protection against mortality (80 % animal death), hence being considered a suboptimal dose (**figure 1**). TH alone induced from 1 to 28 % of parasitemia reduction on the peak, not in a dose dependent manner, and all animals were dead by the 20 dpi (**figure 1**).

Regarding de combos, Posa was fixed in 1.25 mpk and TH was variable from 0.5 to 5 mpk, ranging throughout different drug proportions (**figure 2**). The parasitemia had a reduction rate from 60 to 80 %, again not TH dose-dependent, and cumulative death stretched from 60 to 100 % (**figure 2**). The best effect (antiparasitic activity at the peak plus prolonged survival) was obtained with the combo Posa 1.25 + TH 3.75 (**figure 2**), that was also the best *in vitro* ratio 1Posa:3TH (**table 2**).

DISCUSSION

Drug repurposing and combination have been used in experimental pharmacology for many diseases with successful results that are later on applied in clinical uses, for example the repositioning of nifurtimox and further combination with eflornithine for the treatment of African trypanosomiasis (sun et al 2016; Alirol et al 2013). This is feasible when drugs share a common target in different organisms; however, selectivity can change according to the pathogen in correlation to the mammalian host, and this impact must be carefully evaluated (Oprea and Mestres

2012). For example, several fungicidal compounds that act as selective inhibitors of the CYP 51 enzyme of *T. cruzi* have been identified and even reached clinical trials (Posa and E1224), although no blossoming outcome was obtained due to high rates of therapeutic failure (Morillo et al 2017; Torrico et al 2018). Also, the BENEFIT trial demonstrated that, although effective to reduce largely the parasite load in treated chronic patients, Bz was not able to impair the progression of cardiac damages, reinforcing the need to search for new alternatives (Rassi et al 2017).

In this sense, molecules able to inhibit enzymes of the lipid biosynthesis in *T. cruzi* were previously identified through computational methods (Fügi et al 2015), and presently tested *in vitro* to assess their potential trypanocidal activity, as well as to determine their respective selectivity towards the mammalian host. Two hit compounds were found and further tested in combined schemes. The most promising association was subsequently assayed *in vivo*, using well-established mouse acute models of *T. cruzi* infection (Romanha et al 2010).

The assays were conducted using the proliferative forms of *T. cruzi*: epimastigotes and intracellular amastigotes, present in invertebrate and vertebrate hosts (Tyler and Engman 2001). Our findings showed that six out of 15 inhibitors displayed moderate effect upon epimastigotes, but when tested on intracellular forms found that 4 presented similar potency as Bz. Two of them, which exhibited the highest selectivity indexes (SI > 10) were moved to combinatory approaches: Ro48-8071 (SI = 13.7) and TH (SI = 41.2). The differences in IC₅₀ observed for a same compound upon the studied parasite forms (for example, TH that was inactive against epimastigotes but very active on intracellular amastigotes) can be explained by the diverse intrinsic characteristics of each form, not only regarding metabolism correlated to the surrounding environment (vertebrate *versus* invertebrate hosts), but also with respect to the potential differences in drug resistance mechanisms between forms and strains as reported (Zingales et al 2012, 2014). These data sustain the importance of drug discovery using the relevant proliferative forms for the mammalian host (amastigotes) and confirm that no direct correlation can be obtained from testing epimastigotes instead (De Castro et al 2011; Romanha et al 2010).

Drug combinations were, then, prepared in fixed-ratio proportions as described in the literature (Simões-Silva et al 2016), and the associations were tested on intracellular amastigotes (in L6 cells) in conformity to the foregoing protocols. Regarding the choice of drugs to be co-administered with the two hit compounds

identified, Bz is one of the standard drugs in use for the treatment of CD, being, then, an obvious choice for combo assays in the present study (Coura 2009). Posa and Fexi are well-known very potent anti-*T. cruzi* agents *in vitro* and *in vivo* (Urbina 2010) and that were moved to clinical trials for CD (Bahia et al 2012; 3Morillo et al 2017; DNDi Portfolio 2018). So, TH and Ro48-8071 were combined to Bz, Posa and Fexi and the interaction determined according to the Σ FICI values. Combos made with Ro48-8071 showed additivity and even antagonism, hence they were discarded for the consecutive *in vivo* assays. Combos of Bz and Fexi with TH were also additive, but, surprisingly, the interaction with Posa was essentially synergistic, displaying Σ FICI = 0.2. This kind of interaction was described already for the concomitant administration of TH with aminoglycoside antibiotics, being more effective in inhibiting colony growth of *Staphylococcus aureus* clinical isolates than the respective standard monotherapies (Mitchell et al 2011, 2012; Soltani et al 2017).

From this point forward, Posa + TH was translated to *in vivo* assays. TH was tested before in healthy (normal and pregnant) mice as a supplement in the diet, showing no toxicity at all (Friedman et al 2003). However, this is not the ideal method to establish doses of a treatment, once this hinders the correlation of observed effect and amount of compound ingested. Besides, to our knowledge, there was no study describing doses for *in vivo* treatment. Thus, toxicity was the first concept assessed in murine model and the test showed that TH can be administered p.o. up to 200 mpk without any clinical, hematological nor biochemical damage to the animals (data not shown).

Henceforth, antiparasitic effect was evaluated and TH alone was not as effective as the suboptimal dose of Posa in suppressing parasitemia, and mortality was even higher. The combos, though, showed reduction of parasitemia in comparable levels to Posa 1.25 alone, but the best association was really Posa 1.25 + TH 3.75 which correlates to the most synergistic combo *in vitro* (same drug ratio 1:3, respectively), once it presented improved survival rate, even higher than Posa 10.

TH was assayed before on other trypanosomatids, naming *Phytomonas serpens* and *Leishmania amazonensis*, and the suggested mechanisms of action would be inhibition of trypanothione reductase (Argüelles et al 2016) or inhibition of sterol biosynthesis (Medina et al 2012, 2015).

The interest of this study relied on finding hits *in vitro* that could reach *in vivo* steps and produce knowledge on new molecules (alone and in combo) for scaffold of alternative treatments against *T. cruzi* infection. The distinguished compound identified, TH, is a synthetic substance originally found in tomatoes that has a wide description of its antioxidant, anticarcinogenic and antimicrobial effects, as well as other molecules from the Solanaceae family (Friedman 2013). As far as we know, this is the first report of its use on experimental CD, and the combinatory results presented here are encouraging, not only for further studies with this class of compounds, but also with the application of drug repurposing and combination protocols. These approaches represent cost- and time-savior validated strategies in the search for new alternative treatments for CD, and those are relevant aspects considering the lack of interested devoted for studies in benefit of the poor population around the world.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the opportunity of taking part in the Brazilian-Swiss Joint Research Programme (BSJRP). We also thank Ivana Melo and Patrícia Bernardino da Silva for technical assistance.

FINANCIAL SUPPORT

The fundings were provided by the Swiss National Science Foundation (SNF), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), PAEF and Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). MNCS is CNPq fellow and Cientista do Nosso Estado CNE FAPERJ.

Conflicts of Interest: none.

REFERENCES

ALIROL, Emilie; SCHRUMPF, David; AMICI HERADI, Josué; *et al.* Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy for Second-Stage Gambiense Human African Trypanosomiasis: Médecins Sans Frontières Experience in the Democratic Republic of the Congo. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 2, p. 195–203, 2013.

ARGÜELLES, Alonso J.; CORDELL, Geoffrey A.; MARUENDA, Helena. Molecular Docking and Binding Mode Analysis of Plant Alkaloids as *in vitro* and *in silico* Inhibitors of Trypanothione Reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 1, p. 57–62, 2016.

BAHIA, Maria Terezinha; ANDRADE, Isabel Mayer de; MARTINS, Tassiane Assíria Fontes; *et al.* Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1870, 2012.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 4, p. 389–96, 1962. (6).

BUCKNER, F S; VERLINDE, C L; LA FLAMME, A C; *et al.* Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.

CAL, Monica; IOSET, Jean-Robert; FÜGI, Matthia A.; *et al.* Assessing anti- *T. cruzi* candidates *in vitro* for sterile cidal activity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 165–170, 2016.

CHATELAIN, Eric. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2017.

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

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar; JUNQUEIRA, Angela CV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.

DE CASTRO, Solange L.; BATISTA, Denise G. J.; BATISTA, Marcos M.; *et al.* Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

DINIZ, Lívia de Figueiredo; URBINA, Julio A.; DE ANDRADE, Isabel Mayer; *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

DNDi Portfolio. Drugs for Neglected Diseases Initiative [homepage on the Internet]. Available at <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/>

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

FRIEDMAN, Mendel. Anticarcinogenic, Cardioprotective, and Other Health Benefits of Tomato Compounds Lycopene, α -Tomatine, and Tomatidine in Pure Form and in Fresh and Processed Tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9534–9550, 2013.

FRIEDMAN, Mendel; HENIKA, P.R.; MACKEY, B.E. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 61–71, 2003.

FÜGI, Matthias A.; KAISER, Marcel; TANNER, Marcel; *et al.* Match-making for posaconazole through systems thinking. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 46–51, 2015.

GASCON, Joaquim; BERN, Caryn; PINAZO, María-Jesús. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.

MEDINA, J. M.; RODRIGUES, J. C. F.; DE SOUZA, W.; *et al.* Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1253–1265, 2012.

MEDINA, Jorge Mansur; RODRIGUES, Juliany Cola Fernandes; MOREIRA, Otacilio C; *et al.* Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 48–55, 2015.

MEIRELLES, M. N.; DE ARAUJO-JORGE, T. C.; MIRANDA, C. F.; *et al.* Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. **European Journal of Cell Biology**, v. 41, n. 2, p. 198–206, 1986.

MENNA-BARRETO, Rubem; DE CASTRO, Solange. Clear Shot at Primary Aim: Susceptibility of *Trypanosoma cruzi* Organelles, Structures and Molecular Targets to Drug Treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 10, p. 1212–1234, 2017.

MITCHELL, Gabriel; GATTUSO, Mariza; GRONDIN, Gilles; *et al.* Tomatidine Inhibits Replication of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1937–1945, 2011.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; *et al.* Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 559–568, 2012.

MORILLO, Carlos A.; WASKIN, Hetty; SOSA-ESTANI, Sergio; *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

OPREA, T. I.; MESTRES, J. Drug Repurposing: Far Beyond New Targets for Old Drugs. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 4, p. 759–763, 2012.

ORHAN, Ilkay; ŞENER, Bilge; KAISER, Marcel; *et al.* Inhibitory Activity of Marine Sponge-Derived Natural Products against Parasitic Protozoa. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 47–58, 2010.

PRATA, Aluizio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI JR, Anis; MARIN NETO, José Antonio; RASSI, Anis. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017.

RÄZ, B; ITEN, M; GREYER-BÜHLER, Y; *et al.* The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. **Acta Tropica**, v. 68, n. 2, p. 139–147, 1997.

ROMANHA, Alvaro José; CASTRO, Solange Lisboa de; SOEIRO, Maria de Nazaré Correia; *et al.* *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.

SCARIM, Cauê Benito; JORNADA, Daniela Hartmann; CHELUCCI, Rafael Consolin; *et al.* Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 824–838, 2018.

SIMÕES-SILVA, M. R.; NEFERTITI, A. S. G.; DE ARAÚJO, J. S.; *et al.* Phenotypic Screening *In Vitro* of Novel Aromatic Amidines against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4701–4707, 2016.

SIMÕES-SILVA, M.R.; DE ARAÚJO, J.S.; OLIVEIRA, G.M.; *et al.* Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: In vitro and in vivo assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 145, p. 46–53, 2017.

SOLTANI, Rasool; FAZELI, Hossein; BAHRI NAJAFI, Rahim; *et al.* Evaluation of the Synergistic Effect of Tomatidine with Several Antibiotics against Standard and Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 16, n. 1, p. 290–296, 2017.

SUN, Wei; SANDERSON, Philip E.; ZHENG, Wei. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 7, p. 1189–1195, 2016.

TORRICO, Faustino; GASCON, Joaquim; ORTIZ, Lourdes; *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 419–430, 2018.

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

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

ZINGALES, Bianca; MILES, Michael A.; CAMPBELL, David A.; *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

ZINGALES, Bianca; MILES, Michael A; MORAES, Carolina B; *et al.* Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 828–833, 2014.

Table 1: Activity (IC₅₀ and IC₉₀, µg/mL) and selectivity indexes (SI) of lipid biosynthesis inhibitors on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (strain STIB 980) and intracellular amastigotes (Tulahuen strain in L6 cell lines)

Compound	Epimastigotes		Amastigotes		SI*
	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	
Benznidazole	3.3 ± 0.4	24.5 ± 3.6	0.7 ± 0.2	3.6 ± 3.7	123
Amityptiline (hydrochloride)	17.7 ± 1.9	29.8 ± 0.6	3.8 ± 1.0	6.5 ± 0.9	1.4
FTY720	2.4 ± 0.2	3.9 ± 1.0	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.4	0.5
FTY720 Phosphate	>100	>100	36.3 ± 2.8	65.0 ± 9.3	1.4
AMP-Deoxynojirimicin	63.7 ± 1.9	94.1 ± 0.8	16.9 ± 5.2	31.7 ± 10.1	0.8
D609 (potassium salt)	48.7 ± 8.1	>100	27.2 ± 5.5	52.0 ± 10.5	2.4
Fumonisin B1	>100	>100	36.7 ± 4.2	57.2 ± 5.3	>2.7
Myriocin	>100	>100	44.8 ± 7.0	79.7 ± 3.4	1.4
Ro48-8071	6.6 ± 3.2	16.6 ± 8.3	0.3 ± 0.1	0.9 ± 0.3	13.7
Tomatidine (hydrochloride)	86.8 ± 3.7	98.5 ± 1.1	1.0 ± 1.2	29.1 ± 12.3	41.2
TMP-153	46.8 ± 12.9	>100	0.2 ± 0.2	1.7 ± 0.9	0.3
GW4869 (hydrochloride hydrate)	>100	>100	49.5 ± 27.5	72.0 ± 8.9	1.7
PDMP (hydrochloride)	20.4 ± 3.7	39.1 ± 13.6	5.3 ± 1.4	10.4 ± 3.6	2.7
Bezafibrate	>100	>100	48.0 ± 12.7	72.8 ± 20.0	>2.1
Quinuclidine hydrochloride	>100	>100	56.9 ± 10.0	89.1 ± 2.4	1.3
3-Aminoquinuclidine dihydrochloride	>100	>100	66.5 ± 17.7	65.8 ± 25.0	>0.02

* Selectivity Index based on the results for IC₅₀ and LC₅₀ on intracellular amastigotes and the respective mammalian cells.

Table 2: Sum of the mean fractional inhibitory concentrations indexes (Σ FICIs) of the combinations between Ro48-8071 or tomatidine hydrochloride with benznidazole, posaconazole and fexinidazole in different fixed ratio proportions (1:3, 1:1 and 3:1) on *Trypanosoma cruzi* intracellular amastigotes (strain Tulahuen in L6 cell lines). Σ FICI \leq 0.5 synergism; $0.5 < \Sigma$ FICI \leq 4 additivity; Σ FICI $>$ 4 antagonism.

Compos	Benznidazole				Posaconazole				Fexinidazole			
	Ro48-8071		Tomatidine hydrochloride		Ro48-8071		Tomatidine hydrochloride		Ro48-8071		Tomatidine hydrochloride	
Mean Σ FICIs	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀	IC ₅₀	IC ₉₀
1:3	1.8	1.5	0.7	1.0	1.1	0.8	0.1	0.4	1.4	1.2	1.4	0.9
1:1	4.0	3.3	1.1	1.1	1.6	1.7	0.2	0.7	3.6	3.1	1.1	0.9
3:1	4.0	5.0	1.7	1.3	4.4	3.5	0.3	0.4	5.5	5.0	1.7	1.7

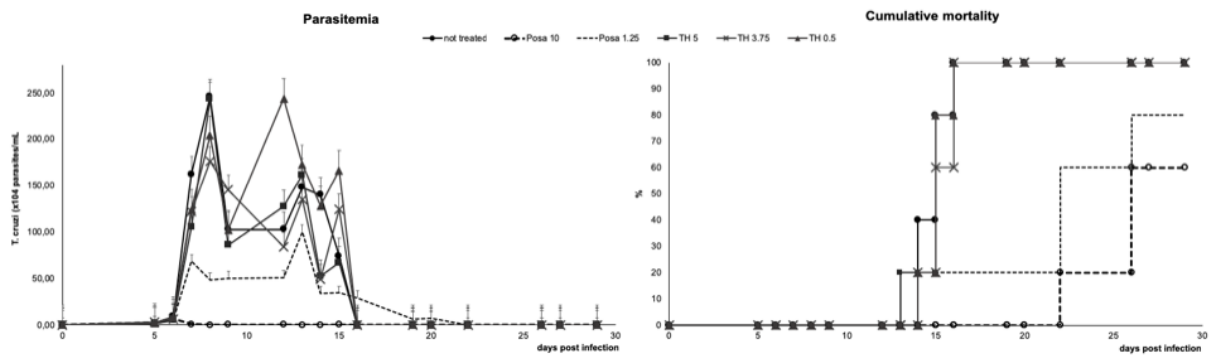


Figure 1: Parasitemia and cumulative mortality of mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) not treated, treated with posaconazole (Posa 10 and 1.25 mpk) or tomatidine hydrochloride (TH 5, 3.75 and 0.5 mpk) for ten days (5 - 14th day post infection).

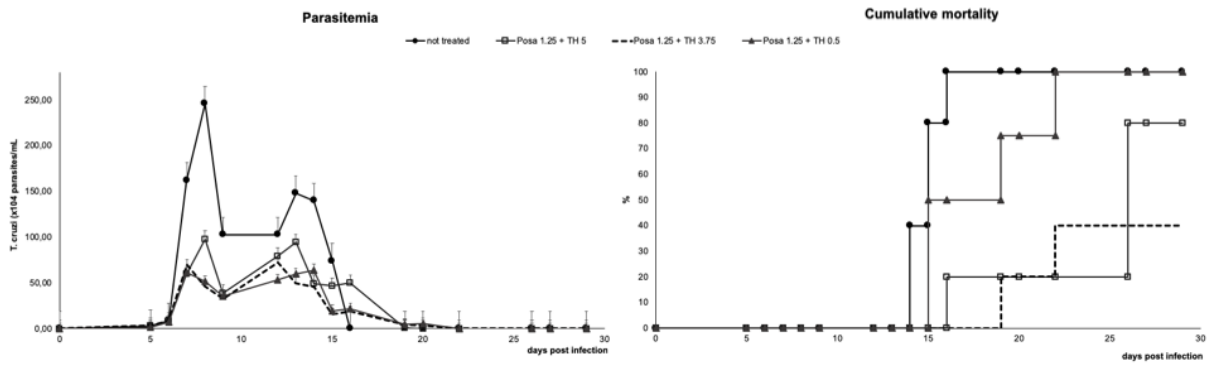


Figure 2: Parasitemia and cumulative mortality of mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) not treated or treated with different co-administrations of posaconazole and tomatidine hydrochloride (Posa 1.25 + TH 5, Posa 1.25 + TH 3.75 and Posa 1.25 + TH 0.5 mpk) for ten days (5 - 14th day post infection).

3.5 Artigo 5 (a ser submetido)

“The impact of experimental helminthic comorbidity of *Schistosoma mansoni* on the course and treatment of murine *Trypanosoma cruzi* acute infection”

O impacto de comorbidade helmíntica experimental de *Schistosoma mansoni* no curso e tratamento de infecção murina aguda por *Trypanosoma cruzi*

Um modelo de comorbidade experimental foi estabelecido para o estudo do curso e respectivo tratamento da fase aguda da doença de Chagas diante da existência de outro patógeno no hospedeiro, o *S. mansoni*, gerando um ambiente fisiologicamente alterado no momento do inóculo com *T. cruzi*. O modelo permite a extrapolação do impacto da coinfeção para a condição de indivíduos provenientes de áreas pobres onde ocorre sobreposição de doenças infecciosas negligenciadas.

The impact of experimental helminthic comorbidity of *Schistosoma mansoni* on the course and treatment of murine *Trypanosoma cruzi* acute infection

Marianne Rocha Simões-Silva¹, Ludmila Ferreira de Almeida Fiuza¹, Ivana D'Almeida Melo¹, Gabriel Melo de Oliveira¹, Cynthia Cascabulho², Kelly Cristina Demarque¹, Aline Nefertiti da Gama¹, Jerônimo Diego de Souza Campos¹, Raiza Brandão Peres¹, Denise Gama Batista¹, Iolanda Deolinda de Souza³, Filomena de Fátima Cruz³, Estér Mota³, Marcelo Pelajo Machado³, Maria de Nazaré Correia Soeiro^{1*}

1 Laboratório de Biologia Celular, Pavilhão Cardoso Fontes, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

2 Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Pavilhão Cardoso Fontes, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

3 Laboratório de Patologia, Pavilhão Gomes de Faria, Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). Avenida Brasil, 4365, Manguinhos, 21040-900. Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author: soeiro@ioc.fiocruz.br

ABSTRACT

Chagas disease (CD) is a neglected illness that occurs in poor areas of Latin America where people mostly have lack of access to health care, sanitization and education. In this sense, as helminth comorbidities co-exist in areas affected by CD, our aim was investigate the potential impact of *Schistosoma mansoni* upon the experimental *T. cruzi* infection. A mice model of acute *Trypanosoma cruzi* infection (Tc) in comorbidity with *Schistosoma mansoni* in early (Sm1) and later (Sm 2) phases of infection was performed to assess some parasitological, immunological and clinical features, including outcomes after standard therapy with Benznidazole (Bz) 100 mg/kg. Parasitemia counting showed no differences between Tc and Tc + Sm1, but Tc + Sm2 had exacerbated parasite load as compared to protozoa infected model (Tc). Findings in electrocardiographic analyses in Tc were less severe in the presence of the helminth, especially in Tc + Sm2. Histopathological analysis of heart samples demonstrated the presence of amastigote nests in mono- and coinfecting mice, including profuse mononuclear leukocyte infiltrate. In the liver there was abundant inflammatory infiltration in Sm1, Sm2, Tc + Sm1 and Tc + Sm2, specially forming the periovular granuloma, besides the existence of necrotic areas and schistosomotic pigment. Granuloma was also found in spleen and heart tissues of co-infected mice. Coupled and single female and male worms were frequently observed in hepatic vasculature of all Sm groups. Flow cytometry demonstrated that Tc infection modulated TCD4 and TCD8 cell populations (in both blood and spleen samples) and the Sm coinfection did not alter this pattern. When assessing the treatment, Tc + Bz and both Tc + Sm (1 and 2) + Bz presented 100 % parasitemia suppression and protected against electrophysiological disturbances, especially regarding cardiac frequency. Treatment also reduced the inflammatory profile observed in heart and liver of mono and coinfecting animals, as well as partially reverted the unbalanced of TCD4 and TCD8 populations induced by the protozoa infection. This model showed the importance of assessing as many aspects as possible when facing a coinfection, demonstrating that treatment may have different clinical and physiological outcomes in this scenario.

INTRODUCTION

Billions of people worldwide live under the poverty line, constantly exposed to diseases caused by virus, bacteria, protozoan and helminths, which are greatly overlooked by local governments, pharmaceutical industries and global public health decision-makers (Hotez 2018). Many of these neglected diseases happen at the same time in an individual, characterizing coinfections that are, generally, not officially notified and insufficiently addressed (Elliott and Yazdanbakhsh 2012). The lack of trained personnel and diagnostic methods hinder treatment and even prophylaxis of a community. Furthermore, many developing countries have deficient epidemiology systems that normally hamper concrete data acquisition, preventing the correct determination of disease endemicity and common areas of occurrence among pathologies. The work of health care professionals in producing an updated epidemiological report and, particularly, assessing comorbidities is continually undermined (Hotez 2018).

Chagas disease (CD) is one of the protozoan diseases declared by the World Health Organization as neglected disease (WHO 2015). It is endemic from the south of United States to the south of Argentina, with growing numbers of cases around the globe due to the international increasing migration movement (Gascon *et al* 2010). Around ten million people live at risk of infection, which can happen through several ways including the classic vectorial transmission of the *Trypanosoma cruzi* by the triatomine bugs, vertical transmission, blood transfusion and organs transplants besides the ingestion of food and drinks contaminated with the parasite, the latter being the main responsible for new cases in Latin America, among others (Coura *et al* 2014). The patients may present or not mild flu-like symptoms during the acute phase that is characterized by patent parasitemia which, later on decreases, due to the host immune response, that controls the parasite burden. Then, 60-70% of the patients enter the asymptomatic phase named indeterminate, while other 20-30% will present, after years or decades, the cardiac and/or digestive forms (Prata 2001). The lack of knowledge about the disease and its intrinsic aspects, such as clinical situation of an infected individual, the areas of occurrence and routes of transmission, besides the absence of efficient diagnostic methodologies or even devices in a health care facility, impair the professionals to address the cases adequately and provide the etiological treatment to the patients. The circumstances lead to a continued incomplete report of data about CD and end up in less than one percent of the infected people having

access to benznidazole (Bz) and nifurtimox, the only drugs available for etiological treatment (Rassi *et al* 2010).

The poor areas in which CD occurs are also affected by numerous infectious diseases, markedly soil-transmitted and water-borne helminthiases, due to low education, scarce basic sanitation and shortage of healthcare services (Coura 2013; Perez *et al* 2014). Among these pathologies, schistosomiasis (SCH) represents a major global health burden, despite prophylactic/therapeutic mass drug administration campaigns (McManus *et al* 2018). SCH still causes a delay in children's development and impairs adults to work, not only in Asia and Africa, but also in Latin America, where the causative agent is predominantly *Schistosoma mansoni* (McManus *et al* 2018). This disease presents two different immunological moments to the human host, basically the first one related to the cercaria skin penetration and the schistosomula migration and maturation through blood circulation and organs, and the second one regarding the establishment of the adult worms at the portal vein space in the liver, in addition to their coupling, egg deposition and granuloma formation (Pearce and MacDonald 2002).

It is not frequent in the literature the reports about CD coinfection with helminths, as well as the human studies do not mention how can one infectious comorbidity of this nature affect *T. cruzi* host response, or even if the etiological treatment can be influenced by the presence of other parasitic pathology. Thus, we assessed the impact of *S. mansoni* infection on the course of experimental CD and its standard treatment with Bz using a murine model in which we exposed the mice to *T. cruzi* during the two distinct phases (earlier – Sm1 and later – Sm2) of the schistosome infection, evaluating the some parasitological, clinical and immunological aspects of these experimental models.

METHODS

Animals

Pregnant Swiss Webster mice were provided by the Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/Fiocruz) (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil). They gave birth on the same day or along three consecutive days in the same week. Five days after birth, half of the mice were used for the infection with *S. mansoni*, while the others were

kept for further grouping as not-infected or infected only with *T. cruzi*. All mice from the same brooding were kept with their respective mother for the next 18 days, when they were weaned and subsequently assorted according to sex. Male and female mice were allocated separately and randomly in the determined experimental groups with no more than six animals per cage. They were housed in a conventional room at 20-24°C, under a 12 h/12 h light/dark cycle, with sterilized water and chow ad libitum.

Parasites

Cercariae of *Schistosoma mansoni* (BH strain) were provided by the Laboratory of Pathology (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Fiocruz), where the complete biological cycle of the parasite is maintained. Bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Y strain – DTU II) were obtained from infected Swiss Webster mice at the parasitemia peak at the Laboratory of Cellular Biology (Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Fiocruz).

Coinfection *Schistosoma mansoni* and *Trypanosoma cruzi*

Five days old Swiss Webster mice were individually exposed to 70 ± 10 cercariae of *S. mansoni* for 15 minutes. The animals were put back together with their respective mother and remained in the same cage until the weaning and random grouping at 18 days old. On the 30th and 45th day post infection (dpi), the designated groups were infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* via intraperitoneal injection, composing the coinfecting groups Tc + Sm1 and Tc + Sm2, respectively. From the same brooding of schistosomotic mice, some were determined the Sm controls for the two different moments of coinfection, being the Sm 1 and 2. In parallel, some of the not infected mice from the batch born together were kept so, or monoinfected with *T. cruzi* (Tc) in correspondent days to the coinfecting above. Besides, Tc animals (mono- and coinfecting) constituted groups aligned to the others that were treated or not with benznidazole 100 mg/Kg (Bz 100) (LAFEPE, Recife, Pernambuco, Brazil) *per oral* for five consecutive days, starting at the 5 day of infection. The animals were monitored for 15 days after Tc infection, as well as their correspondent groups, being, then, euthanized in two different endpoints (45 and 60 dpi of Sm infection, corresponding to Sm1 and Sm2).

Parasitemia, mortality rate, electrocardiogram (ECG), parasitological stool examination

Parasitemia was daily assessed by direct microscopy counting of *T. cruzi* in 5µL of blood according to the Pizzi-Brener method (Brener 1962), as well as the mortality also daily checked (Simões-Silva *et al* 2017). The cardiac function of all the animals were evaluated by electrocardiogram (ECG) on the day corresponding to the 14 dpi of the Tc infection (Simões-Silva *et al* 2017). Parasitological stool examination was performed weekly since the 25 dpi of Sm infection up to the endpoint, to confirm the presence of the helminth and follow the elimination of the eggs along the Sm and the Tc + Sm infections. The Hoffman method was adapted to the experimental settings.

Histopathological analyses

At the day correspondent to the 15 dpi of Tc infection, the groups were euthanized according to EP and LP. Heart and liver were collected, fragmented, and fixed in 10% buffered formalin. Routine histological techniques were carried out to prepare the tissues for comparative morphology analyses. Briefly, the fixed tissues were dehydrated in absolute ethanol, cleared in xylene, embedded in paraffin, cut and mounted on glass slides, and finally stained with Hematoxilin-Eosin (Simões-Silva *et al* 2017). For cardiac tissues, at least two duplicate cuts were evaluated per animal, in all approximately four sections per animal for each organ. For the hepatic tissue, three areas of each organ were selected and analyzed at least in duplicate, totalizing approximately 6 sections per animal. The classification of the lesions was based on INHAND (International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria) (Jorge and Castro 2000; Carvalho *et al* 2008; Berridge *et al* 2016).

Flow cytometry

Blood was collected by cardiac puncture in the presence of heparin and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were obtained by Ficoll-Histopaque 1077 gradient (StemCell Technologies, Vancouver, BC, USA). Mice splenocytes were obtained by mechanical dissociation, and erythrocytes were lysed by hypotonic shock in culture

medium RPMI (Gibco, Paisley, Great Britain) diluted 1:10 in water for 10 seconds. The cells were washed in cold RPMI 1640 and counted in a Neubauer chamber. For phenotypic labeling, all cells were incubated for 30 minutes at 4°C with RPMI supplemented with 10% fetal calf serum and 10% inactivated normal sheep serum for FcGR blockage. Cells were incubated for 30 minutes at 4°C with anti-CD3 PE-CF594, anti-CD4 APC-Cy7, anti-CD8 PerCP, anti-CD62L PE-Cy7, anti-CD44 PE, anti-CD127 Alexa 488, anti-CD197 APC and anti-NK1.1 PE as recommended by the manufacturer (Biolegend, San Diego, CA, USA). All samples were washed twice in RPMI and acquired in a Cyan ADP analyzer flow cytometer (Beckman Coulter, Houston, TX, USA). Data analysis was performed using Summit version software 4.3 (Beckman Coulter, Houston, TX, USA).

Statistical analyses

Four assays were conducted, and the statistical analyses were performed using Student's T test or two-way ANOVA followed by Bonferroni posttest and results were considered significant when p value was ≤ 0.05 .

Ethics

All procedures were carried out in accordance with the guidelines L – 38/16 established by the Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/ Fiocruz).

RESULTS

Swiss mice five days old were exposed for 15 min to cercariae of *S. mansoni* (BH strain) and at 18 days of age, weaned and grouped. Sm infected mice eliminated mature eggs in feces since the 28-33th dpi until the endpoint (45 and 60 dpi), presenting around 8-14 eggs per animal (data not shown). On the 30th dpi, some of the Sm and uninfected mice were inoculated with *T. cruzi* (Tc). All animals were euthanized after 15 dpi of protozoa infection, which corresponds to 45 (Sm1) and 60 (Sm2) days post infection with Sm. In parallel, each experiment included a not infected mice group. Additionally, the etiologic treatment against the protozoa was assessed in Tc mono-

and coinfecting groups using Bz 100 mg/Kg *per oral* for five consecutive days (5-9 dpi of Tc).

All Sm mice presented ascites that aggravated along the days, as well as paleness of oral and nasal mucosa, paws, ears and tail, either in mono- or coinfection (suggestive of anemia). The oviposition was the same regardless the studied group. Cachexia was more accentuated in Sm2 (mono and co-infected) than Sm1 groups.

Regarding parasitemia of protozoa infection, all Tc infected mice peaked on the 8th dpi (**figure 1A**). Tc + Sm1 group displayed equivalent parasite levels, reproducing the same infection kinetics of monoinfection (**figure 1A**). Oppositely, Tc + Sm2 mice had higher levels of parasitemia in relation to the Tc alone (**figure 1B**). Regarding mortality, in all groups, maximum of 60 % of animal death was achieved until each endpoint (data not shown).

The impact of the helminthic comorbidity on the cardiac physiology was analyzed by ECG. The most frequent and intense alterations were the atrioventricular block (AVB) and sinus bradycardia (BRA). Mice monoinfected with Tc (**figure 2B**) presented atrioventricular block (AVB) (PR = 47.0 ± 7.8 ms) and sinus bradycardia (BRA) (HR = 637 ± 33 bpm). Regarding monoinfection with the helminth, Sm1 mice presented AVB (PR = 50.0 ± 28.6 ms) (**figure 2C**). Sm2 did not display changes in any of the evaluated parameters, presenting similar profile as uninfected mice (**figure 2A, E**). Tc + Sm1 presented BRA (HR = 634 ± 171 bpm) and AVB (PR = 52.7 ± 10.4 ms) (**figure 2D**) as in Tc (**figure 2B**). Regarding the incidence of cardiac alterations, these events were observed in 75 % of Tc, 33 % of Sm1, 66% Tc + Sm1 and only 17 % in Tc + Sm2 (**figure 2B-F**).

Histopathology analysis of heart samples showed diffuse inflammation mainly composed by mononuclear leukocytes and the presence of amastigotes nests in all Tc infected animals (**figure 3A**). In the liver, most of the Sm animals (either mono- or coinfecting) presented altered architecture, with intense parenchymal inflammation with prevalence of periovular granulomas, areas of pre-granulomatous lesions or in the form of inflammatory infiltrates dispersed in the parenchyma or perivascular were also observed, with a large presence of eosinophils (**figure 4**). Necrosis foci were observed in the liver of some animals, with the presence of schistosomal pigment dispersed in the hepatic parenchyma (**figure 4**). Interestingly, a cardiac periovular granuloma was

observed in Tc + Sm2 animal (**figure 5B**). Adult worms were found in the hepatic veins, either as a couple or single (**figure 5B-E**).

Flow cytometry analyses of blood samples showed a reduction on the percentage (%) of TCD4 concomitantly to a rise in TCD8 population in Tc mice while no major alterations were found for Sm group (**figures 6**). Tc + Sm1 mice displayed a similar profile of TCD4 and TCD8 modulation as Tc infection alone (**figure 6**). When effector lymphocytes were evaluated a higher percentage for both TCD4 and TCD8 cells was detected in Tc mono and co-infection (Sm1 and Sm2) (**figure 6B and E**). For effector memory, Sm infection induced an increase in both TCD8 and TCD4 cells, being about 7-fold higher for the later population when compared to noninfected animals (**figures 6C and F**). Co-infected groups showed an increase in TCD4 effector memory in comparison to Tc alone and noninfected mice but not as high as Sm alone (**figure 6c and f**). On the late stage (Tc + Sm2), a quite similar profile was observed as compared to Sm1 alone (**figure 6f**).

The administration of Bz suppressed the parasitemia and provided >90% animal survival regardless if mono or co-infected groups were evaluated (data not shown). Additionally, the treatment with Bz promoted an improvement of the electrical cardiac conduction system in Tc and Tc + Sm, especially in comparison to not treated Tc (**supplementary table 1**). Histopathology showed absence of parasite nests and lower inflammation in cardiac tissues in all treated groups (data not shown). The therapy did not impact the profile of the liver inflammatory infiltration (**figure 4**).

Furthermore, flow cytometry studies using the blood of treated animals showed that Bz was able to revert the modulation of TCD4 triggered by the protozoa mono and Sm1 co-infection (**figure 6A and D**). The percentage of TCD4 and TCD8 effector lymphocytes was reduced after treatment of all animal groups (**figure 6B and E**). There was an expressive increase in effector memory TCD4 cells in Tc + Sm1 + Bz (**figure 6C**).

DISCUSSION

The model presently described assessed the impact of a helminthic comorbidity on acute experimental Chagas disease and the course of etiological treatment with the standard drug Bz. To begin with, Tc groups demonstrated characteristic parasitemia

and mortality rates as reported previously for Y strain infection of Swiss Webster mice (Simões-Silva *et al.* 2017). In our Sm mice models, the different worm stages could be observed including the coupled and uncoupled adult forms and the granuloma in liver and even in the heart samples, with the release of eggs detected in the animal feces.

Mice previously infected with Sm for 30 days, that corresponds to earlier helminthic infection, and then inoculated with Tc showed a similar behavior as above reported. However, when the other model was employed and that corresponds to a later schistosoma infection (Tc + Sm2), exacerbated parasitemia was found in comparison to Tc alone. These results corroborated previous findings (Kloetzel *et al.* 1973, Rodrigues *et al.* 2017) that described parasitemia exacerbation in mice inoculated with Tc during a chronic Sm infection. The first paper suggested a possible correlation with immune events, but no further test was performed at that moment (Kloetzel *et al.* 1973). Meanwhile, the second study demonstrated the involvement of the host immune response, with the overlapping of Th2 (schistosomiasis) and Th1 (Chagas disease) immunological patterns modifying the host resistance against both pathogens (Rodrigues *et al.* 2017). It is possible that the increased Tc blood parasitism presently found in our later Sm2 coinfection model is also due to a shift in the host immune response, from Th1 to Th2 profile, as suggested by Rodrigues *et al.* (2017), leading to less effective control of parasite burden during this coinfection. However, our flow cytometry analyses failed to demonstrate significant alteration on effector populations of TCD4 and TCD8 profiles among the Tc and co-infected animals, although for the effector memory, the co-infected showed an increase in the percentage of TCD4 in comparison to Tc alone. As other immunological parameters were not assessed, further studies are required to clarify this matter.

Presently ECG findings demonstrated that Tc and Sm1 had similar alterations (AVB and BRA), but Tc mice presented higher incidence of these disturbances as already described in this experimental model (Campos *et al.* 2016). Later in the infection, Sm2 showed a total regression of the electrical alterations, with cardiac conduction system preserved. The cardiac alterations observed in Sm1 (earlier) but not Sm2 (later) groups could be related to the worm cycle itself. During the early phase of Sm infection, the worms have a systemic cycle necessary for maturation and their passage through the organs, particularly heart and lung, then, being able to cause transient damages that may be resolved in the later phase of the illness and the adult worms set themselves in portal vein space and small intestine (Prata 1978). Also, since

a cardiac granuloma was found in one mouse, we cannot discard the possibility of its interference in the heart physiology.

On the other hand, Tc + Sm1 had a lower incidence of mice with cardiac arrhythmias, with the extent of the heart insult correlating to the Sm infection phase. Hence, the comorbidity in a later phase of Sm infection reduces the severity of arrhythmias induced in acute experimental CD, but it seems to involve other mechanism not related to parasite load since it does not correlate to the parasitemia levels, and thus, possibly the immune response could play a role and needs to be deeper evaluated.

Regarding treatment with Bz *per oral* for five days, from 5 to 9 dpi of Tc employing well standardized therapeutic protocol (Simões-Silva *et al* 2017), we found that Bz promoted the same reduction in the blood parasite load in all treated mice, showing that the coinfection did not seem to pose a problem to drug effectiveness. Even in Tc + Sm2 that parasitemia was found to be exacerbated, Bz suppressed 100 % of it. Corroborating the effect on parasitemia, there was a protection concerning heart damages: upon treatment, there was less incidence of arrhythmias in coinfecting treated groups than not treated. Heart protection has been described before upon use of trypanocidal drugs in acutely Tc infected mice (De Souza *et al.*, 2005), and presently it is demonstrated that a helminth coinfection does not interfere in the role of Bz not only in parasitemia suppression, but also against electrophysiological cardiac disruptions.

Still in agreement to the data just described above, histological analyses showed the improved tissue environment during the treatment. Bz protected against infection, since the analysis by light microscopy revealed a large decrease of amastigote nests and inflammation in the heart, no matter the moment of the helminth coinfection.

Although the findings regarding the treatment upon coinfection were so far compatible, flow cytometry protocols demonstrated some distinct outcomes. Except for the effector memory cells, the analysis of TCD4 and TCD8 populations, in general, revealed that the coinfection had a similar immune response to Tc monoinfected animals, and thus, it was expected that the administration of Bz would revert the events in the same way for all groups, and it did happen for Tc + Bz and Tc + Sm1 + Bz. The treatment of Tc + Sm2, though, could not fully restore the immune events to the levels observed for Tc + Bz. It seems that the treatment of the later coinfection exerted less

influence in the immune response in related to TCD8 effector cells and TCD4 effector memory cells. This kind of event, howbeit the efficacy of Bz was shown to not be affected in many aspects, should be taken into consideration while handling patients especially those with known other parasitic comorbidities aiming to avoid therapeutic failure since host immune status may indeed influence therapeutic outcomes.

The overlap of diseases in tropical regions, mainly in poor areas, demands a special attention from health policy makers and healthcare workers, once the epidemiological trends are constantly transformed (Hotez 2018). CD has been spread to other continents due to global migration and imported cases are now a reality in countries that are not yet prepared for its control and patient assessment (Gascon *et al* 2010). Besides, there has been changes in transmission patterns in traditional endemic areas, for example Brazilian Amazonia and the increasing oral infection due to ingestion of contaminated food (Coura *et al* 2014). CD dynamics transformed from rural to more urban, and this came along with comorbidities. Nowadays it is frequent to observe cases of coinfection with HIV, *Mycobacterium* and *Leishmania* in several Latin-American countries, including Brazil, Colombia and Argentina (Hoyos *et al* 2016; Villamil-Gómez *et al* 2016; Stauffert *et al* 2017). The impact for patients is evaluated in many aspects, for example, therapeutic and clinical. Concerning treatment, the decision of which disease to tackle first is complex, or even if both are to be taken care of at the same time with less disadvantages as possible to the patient. In addition, when medicating an individual for different diseases, attention must be paid to the risk of drug interaction, once the impact has not been yet measured, due to the novelty of case-scenarios of overlapping diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

The fundings were provided by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), PAEF and Instituto Oswaldo Cruz (IOC/Fiocruz). MNCS is CNPq fellow and Cientista do Nosso Estado CNE FAPERJ.

REFERENCES

BERRIDGE, Brian R.; MOWAT, Vasanthi; NAGAI, Hirofumi; *et al.* Non-proliferative and Proliferative Lesions of the Cardiovascular System of the Rat and Mouse. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 3_Suppl, p. 1S-47S, 2016.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 4, p. 389–96, 1962. (6).

CAMPOS, Jerônimo D. S.; HOPPE, Luanda Y.; DUQUE, Thabata L. A.; *et al.* Use of Noninvasive Parameters to Evaluate Swiss Webster Mice During *Trypanosoma cruzi* Experimental Acute Infection. **Journal of Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 280–285, 2016.

CARVALHO, Omar dos Santos; COELHO, Paulo Marcos Zech; LENZI, Henrique Leonel. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2008.

COURA, Jose Rodrigues. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, 2013.

COURA, José Rodrigues; VIÑAS, Pedro Albajar; JUNQUEIRA, Angela CV. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.

DE SOUZA, Elen M.; OLIVEIRA, Gabriel M.; SOEIRO, Maria de Nazaré C. Electrocardiographic Findings in Acutely and Chronically *T. cruzi*-infected Mice Treated by a Phenyl-Substituted Analogue of Furamidine DB569. **Drug Target Insights**, v. 2, p. [117739280700200](https://doi.org/10.1080/20083901.2007.117739280700200), 2007.

ELLIOTT, Alison; YAZDANBAKHSH, Maria. Troubles never come alone: **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 3, p. 211–213, 2012.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; *et al.* The Anti-Trypanosoma cruzi Activity of Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas' Disease Is Less Dependent on Gamma Interferon than That of Benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1359–1364, 2007.

GASCON, Joaquim; BERN, Caryn; PINAZO, María-Jesús. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.

HOTEZ, Peter J. Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. *In: Advances in Parasitology*. [s.l.]: Elsevier, 2018, v. 100, p. 29–38.

JORGE, Tania Araújo; CASTRO, Solange Lisboa, orgs. Doença de chagas: manual para experimentação animal [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85- 85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

KLOETZEL, Kurt; FALEIROS, José Justino; MENDES, Sergio Ruas; *et al.* Concomitant infection of albino mice by *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni* parasitological parameters. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 5, p. 652–658, 1973.

LENZI, Henrique L; KIMMEL, Eitan; SCHECHTMAN, Helio; *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. suppl 1, p. 141–151, 1998.

MCMANUS, Donald P.; DUNNE, David W.; SACKO, Moussa; *et al.* Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 2018.

OSAKUNOR, Derick Nii Mensah; SENGEH, David Moinina; MUTAPI, Francisca. Coinfections and comorbidities in African health systems: At the interface of infectious and noninfectious diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006711, 2018.

PEARCE, Edward J.; MACDONALD, Andrew S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 499, 2002.

PEREZ, Catherine J.; LYMBERY, Alan J.; THOMPSON, R.C. Andrew. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 176–182, 2014.

PRATA, Aluizio. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RASSI, Anis; RASSI, Anis; MARIN-NETO, José Antonio. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RODRIGUES, João Paulo Ferreira; CALDAS, Ivo Santana; GONÇALVES, Reggiani Vilela; *et al.* *S. mansoni* - *T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, v. 66, p. 43–52, 2017.

SCHOLTE, Ronaldo G.C.; GOSONI, Laura; MALONE, John B.; *et al.* Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, p. 57–63, 2014.

SIMÕES-SILVA, M.R.; DE ARAÚJO, J.S.; OLIVEIRA, G.M.; *et al.* Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *In vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 145, p. 46–53, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Records** v. 90, p. 33–43, 2015.

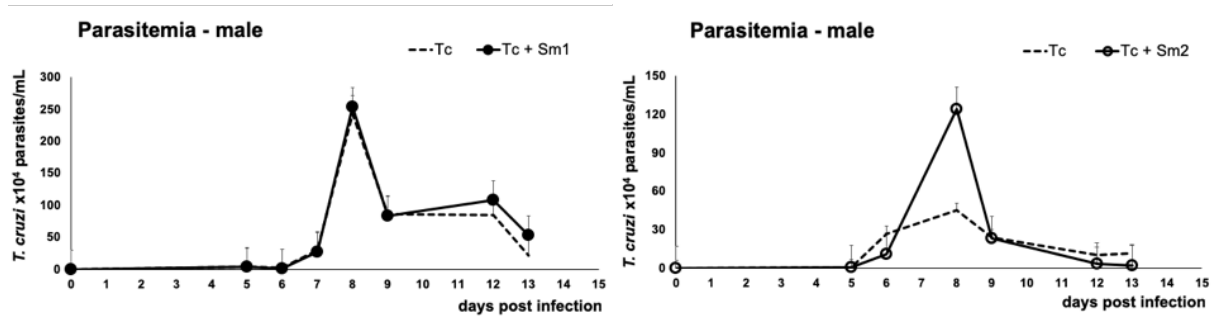


Figure 1: Parasitemia in Swiss Webster male mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Y strain) (Tc), experimentally coinfecting or not with *Schistosoma mansoni* (Sm) (at the 30th or 45th day post Sm infection, respectively 1 and 2).

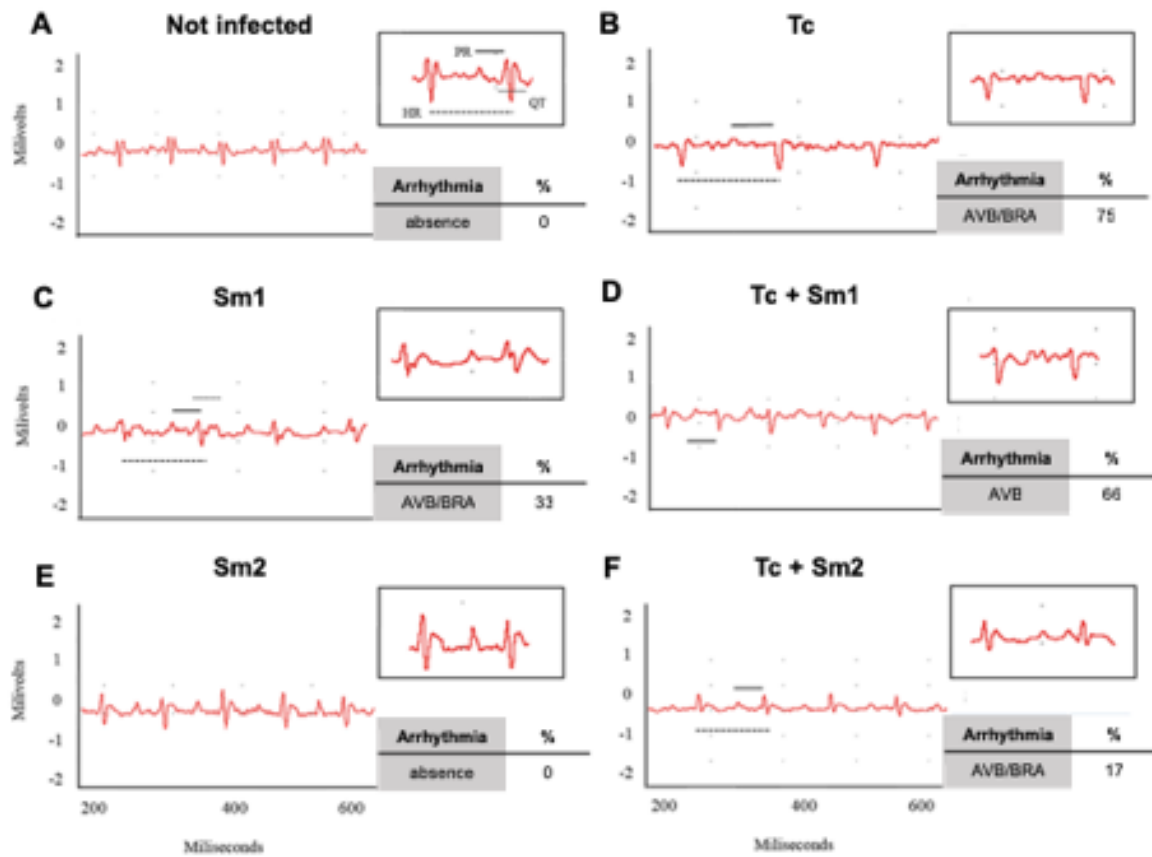


Figure 2: Analysis of the ECG traces and arrhythmias incidence (%). Qualitative analysis of the cardiac electrical conduction system in not infected mice (**A**), or with experimental acute infection of *Trypanosoma cruzi* (Tc) (**B**), experimental infection of *S. mansoni* (at the 30th or 45th day post Sm infection, respectively Sm1 and 2) (**C** and **E**), and coinfection between both Tc + Sm1 (**D**) and Tc + Sm2 (**F**). The significant incidence of cardiac rhythm abnormalities was related to the PR interval (continuous line), QT interval (punctuated line) and heart rate (dashed line). In the tables in detail, the percentage of mice that presented the related cardiac disturbances: absence of arrhythmias, atrioventricular block (AVB) and sinus bradycardia (BRA).

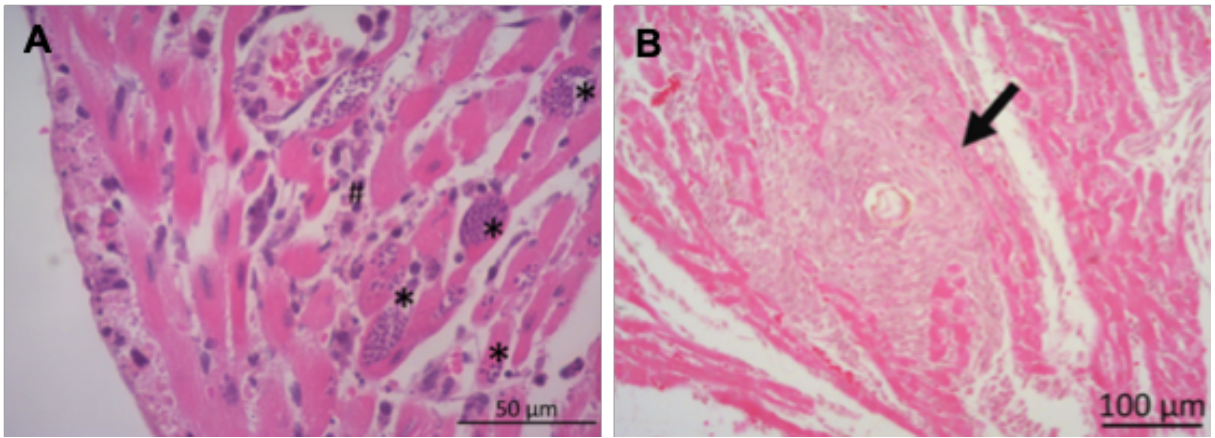


Figure 3: Histopathology of heart sample fragments of Swiss mice infected with *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni*. (A) Tc + Sm1 cardiac tissues showing mononuclear inflammatory infiltrate (arrow), and the presence of amastigote nests (asterisks) of *T. cruzi* inside of cardiomyocytes. (B) Fragment of the heart of Tc + Sm2 showing periovular granuloma (arrow) in the myocardium. (H.E., 40X magnification).

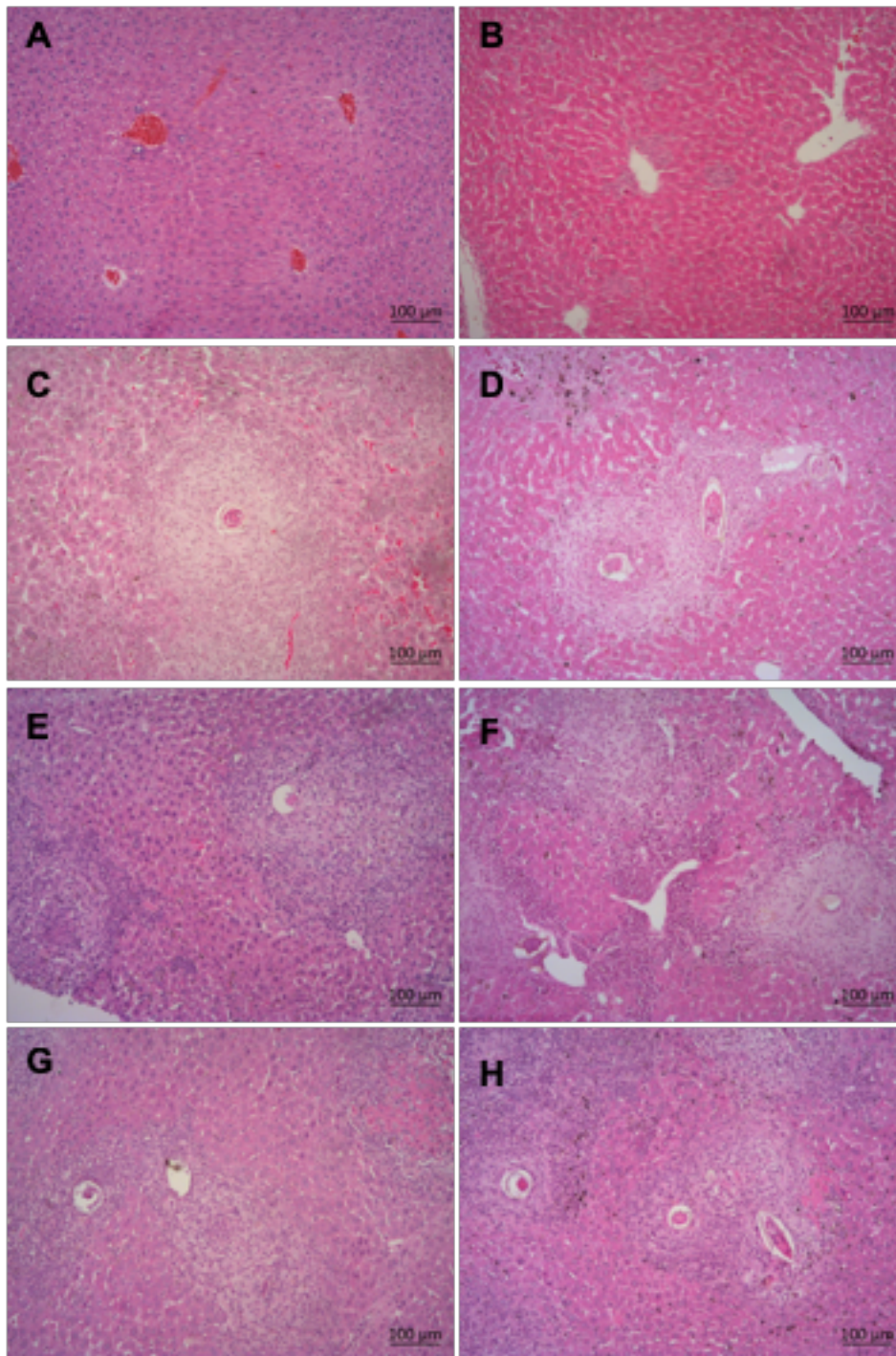


Figure 4: Representative fragments of the liver of Swiss Webster male mice not infected and with experimental acute infection of *Trypanosoma cruzi* (Tc), experimental infection of *Schistosoma mansoni* (at 30th or 45th day post infection, respectively Sm1 and Sm2), and coinfection between both Tc + Sm1 and Tc + Sm2. Groups (+ Bz) were treated for five days with oral benznidazole (Bz) 100 mg/Kg, starting at the onset of Tc parasitemia. (A) not infected; (B) Tc; (C) Sm1; (D) Sm2; (E) Tc + Sm1; (F) Tc + Sm2; (G) Tc + Sm1 + Bz; (H) Tc + Sm2 + Bz. Inflammatory infiltrate and periovular granuloma can be observed in C, D, E, F, G, and H (H.E., 10X magnification).

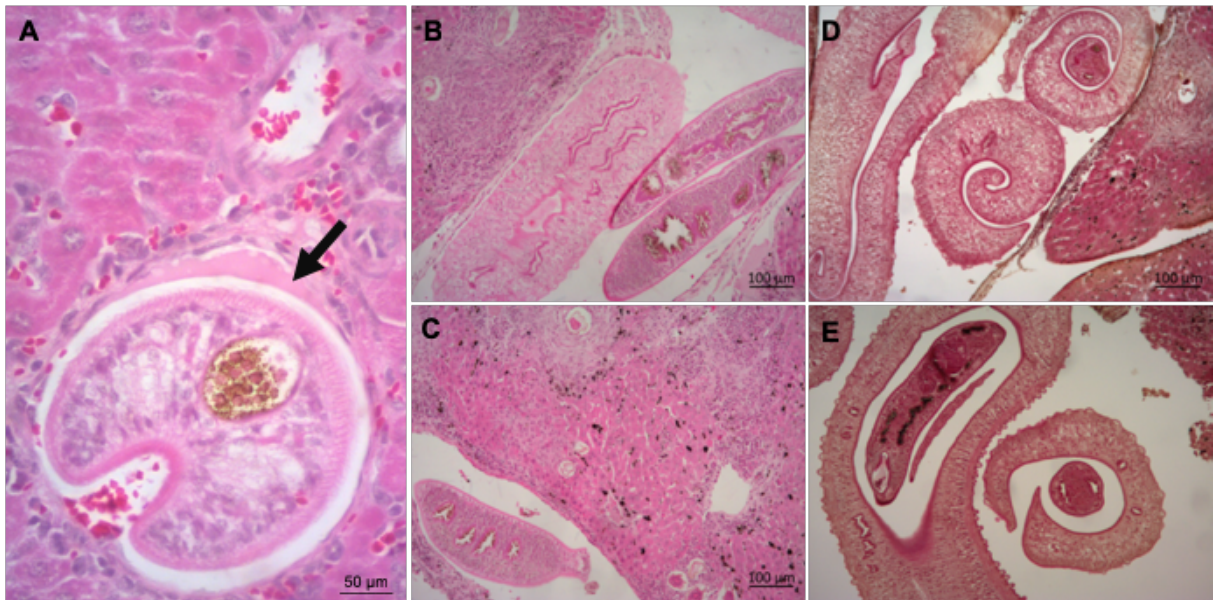


Figure 5: Histopathology of liver sample fragments of Swiss mice infected with *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni*. (A) *S. mansoni* observed inside portal vein, Tc + Sm1 (arrow) (H.E., 40X magnification). (B and C) Liver fragments revealing the presence of *S. mansoni* inside hepatic vases. Schistosomotic pigment disperse (arrow) through the tissue, periovular granuloma in hepatic parenchyma (H.E., 10X magnification). (D and C) Liver fragments revealing the presence of *S. mansoni* inside hepatic vases (Masson's Thrichrome, 10X magnification).

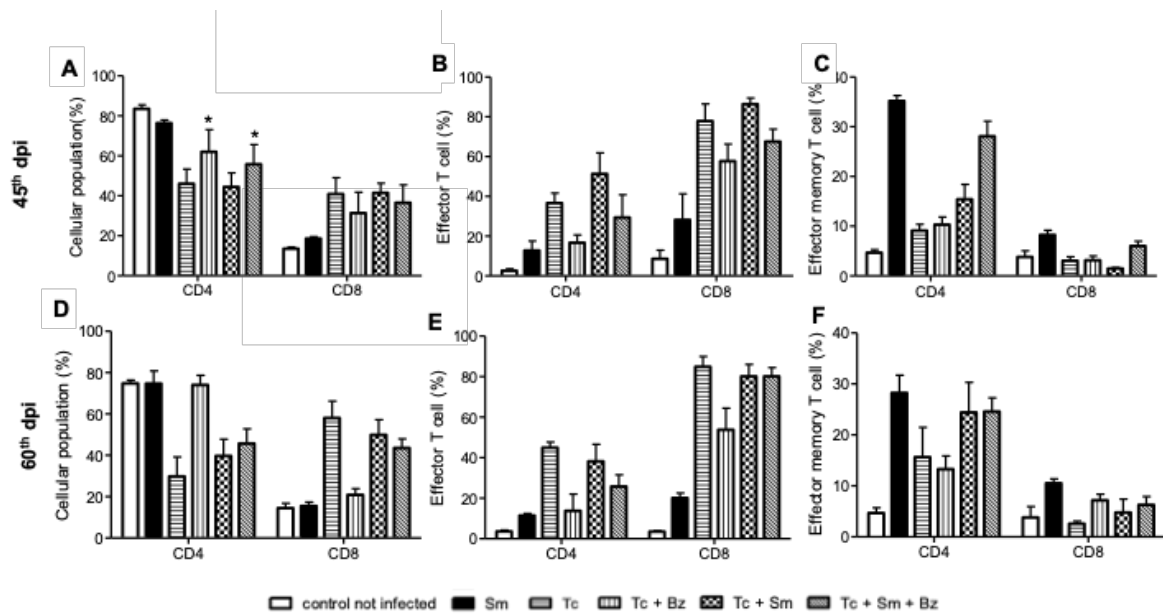


Figure 6: TCD4 and TCD8 cells populations from blood of Swiss Webster male mice not infected and with experimental acute infection of *Trypanosoma cruzi* (Tc), experimental infection of *Schistosoma mansoni* (at 30th and 45th day post infection, respectively Sm1 and Sm2), and with both coinfections. Groups (+ Bz) were treated for five days with oral benznidazole (Bz) 100 mg/Kg, starting at the onset of Tc parasitemia.

Supplementary table 1: Quantitative analysis of the cardiac electrical conduction system in not infected mice, or with experimental acute infection of *Trypanosoma cruzi* (Tc), and coinfection with *Schistosoma mansoni* (at the 30th or 45th day post Sm infection, respectively Sm1 and 2). Groups (+ Bz) were treated for five days with oral benznidazole (Bz) 100 mg/Kg, starting at the onset of Tc parasitemia. The ECG evaluated the time of heart's electrical conduction in milliseconds (ms) in the different myocardial regions, concerning the P wave, intervals PR, QRS and QT, as well as cardiac frequency (heart rate - HR) in beats per minute (bpm).

Group	P wave (ms)	PR interval (ms)	QRS interval (ms)	QT interval (ms)	Heart Rate (bpm)
Not infected	10.7 ± 2.3	31.3 ± 3.8	8.3 ± 1.2	18.3 ± 2.5	756 ± 11
Tc	13.7 ± 2.1	47.0 ± 7.8	10.3 ± 1.5	24.7 ± 4.5	637 ± 33
Tc + Bz	14.3 ± 2.6	43.8 ± 9.6	9.0 ± 0.8	20.0 ± 2.7	710 ± 55
Tc + Sm1 + Bz	11.3 ± 1.5	31.7 ± 3.5	10.0 ± 1.0	23.3 ± 3.2	710 ± 48
Tc + Sm2 + Bz	13.7 ± 1.2	35.7 ± 7.2	8.3 ± 0.6	23.3 ± 3.2	700 ± 13

4 DISCUSSÃO

Quando Carlos Chagas descreveu em 1909 a doença causada pelo *Trypanosoma cruzi*, realizou um feito jamais repetido por qualquer outro cientista até hoje. Sozinho elucidou o ciclo do parasita, detalhou as formas existentes nos hospedeiros invertebrado e vertebrado, comentou sobre os reservatórios naturais, e incluiu minuciosa descrição clínica (Chagas 1909). Desde então, os avanços científicos permitiram pormenorizar ainda mais seus estudos, refletindo na redução de novos casos através do controle das principais vias de transmissão (vetorial clássica, por transfusão de sangue/derivados e transplantes de órgãos) via adoção de políticas de saúde pública. Contudo, apesar dos avanços, há ainda sérios desafios a ser enfrentados, incluindo, a identificação de novos medicamentos mais ativos e seletivos, cuja busca já teve início tão logo a doença de Chagas foi descrita.

Apesar dos constantes esforços, apenas a partir de 1960 dois fármacos foram introduzidos com sucesso na clínica, tendo sido esta família de nitroderivados identificada pelo Dr. Zigman Brener a partir de estudos conduzidos, em esquema de longos períodos de administração, com a nitrofurazona que resultou na exaustão parasitária de modelos murinos de infecção experimental por *T. cruzi* (Brener 1961). Devido ao inferior perfil tóxico em relação a nitrofurazona, benznidazol e nifurtimox foram introduzidos na clínica médica e são até hoje as únicas alternativas de terapia apesar de suas limitações. No Brasil, o nifurtimox foi descontinuado, sendo o benznidazol o medicamento de primeira escolha segundo Ministério da Saúde do Brasil e a Organização Mundial de Saúde (OMS). Além dos extensos e frequentes efeitos colaterais, observa-se resistência natural de algumas cepas do parasita, além da ineficácia na fase crônica tardia da doença de Chagas. O benznidazol ainda exibe baixa distribuição, e, infelizmente, menos de 1 % dos portadores têm hoje acesso ao tratamento (Chatelain 2017).

Na presente tese, o objetivo foi contribuir para a identificação, por meio de protocolos bem estabelecidos, de metodologias *in vitro* e *in vivo*, acerca de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas. O desenho e síntese *de novo* de moléculas e a descoberta de novos fármacos são processos longos e de alto custo, portanto a estratégia de reposicionamento tem sido fortemente estimulada na busca de alternativas terapêuticas para diversas enfermidades, sobretudo de doenças negligenciadas, uma vez que os passos relacionados à farmacocinética e segurança

originais de seu uso já são descritos e aprovados por agências regulatórias (Kaiser et al. 2015).

Assim, neste contexto, iniciamos nossos estudos pelos ensaios de reposicionamento do metronidazol, um derivado nitroimidazólico de amplo espectro de atividade antiparasitária (Roe 1977). Metronidazol tem sido usado para o tratamento de giardíase (Einarsson et al. 2016) e tricomoníase (Menezes et al. 2016). Com relação ao *T. cruzi*, seu potencial efeito tripanossomicida em esquemas de monoterapia foi pouco explorado; a maioria dos estudos foi realizada há décadas, por vezes, inclusive, utilizando outras espécies de *Trypanosoma* (por ex., *T. dionisii*) como modelos *in vitro* para os ensaios de triagem de efeito anti-*T. cruzi* (Baker e Selden 1981).

Em relação à eficácia em afetados pela doença de Chagas, Levi e Neto em 1970 administraram doses altas de metronidazol em esquema prolongado (dose diária de 1,500 mg durante dois meses) e reportaram que o medicamento foi bem tolerado, embora tenha sido incapaz de melhorar as condições clínicas dos pacientes, que mantinham sorologia anti-*T. cruzi* positiva e persistente. Outro relato clínico mostra um caso agudo em Honduras que foi tratado por 15 dias com metronidazol (três vezes ao dia pelos primeiros cinco dias com dose de 500 mg, seguido de 250 mg três vezes ao dia durante os últimos dez dias) que não resultou em toxicidade, confirmando o perfil de segurança do medicamento, ainda que incapaz de promover cura medida pela negatização sorológica (Lainez e Fernandez 1971). Em 1993, Blandón e colaboradores (1993) trataram no Panamá portadores agudos e crônicos utilizando diferentes esquemas terapêuticos de metronidazol por via oral ou intravenosa, utilizando doses de 15 a 25 mg/Kg por cinco dias na fase aguda, e 250 e 500 mg via oral na fase crônica por 180 dias. Novamente a tolerabilidade ao medicamento foi demonstrada, e todos os pacientes sem cardiomiopatia chagásica (100%) apresentaram sorologia negativa para a doença.

Assim, haja vista os poucos e controversos dados disponíveis na literatura sobre testes de Mtz em modelos experimentais de doença de Chagas, assim como de seus benefícios clínicos, nosso objetivo foi revisitar o potencial tripanossomicida de metronidazol sobre *T. cruzi* (ensaios *in vitro* e *in vivo*) utilizando protocolos padronizados (Romanha et al. 2010; Guedes-da-Silva et al. 2017), explorando ao mesmo tempo, o possível benefício da combinação de metronidazol com benznidazol.

Nossos testes *in vitro* e *in vivo* corroboraram com o perfil de segurança previamente descrito para metronidazol. Demonstramos que o medicamento não

exibiu toxicidade animal, sendo bem tolerado quando dado a camundongos em doses de até 2000 mg/Kg. No entanto, nossos ensaios revelaram que metronidazol não foi capaz de exibir resultados promissores como agente tripanossomicida, apresentando valores de EC₅₀ superiores a 200 µM sobre formas sanguíneas e intracelulares de *T. cruzi* (cepas Y e Tulahuen, respectivamente) e, conseqüentemente, gerando baixos índices de seletividade (IS), muito inferiores ao benznidazol. De modo a investigar se metronidazol poderia, interagir com benznidazol promovendo um evento aditivo ou sinérgico, prosseguimos os estudos com a realização dos protocolos de combinação já pré-estabelecidos na literatura. A interação *in vitro* entre os dois compostos sobre *T. cruzi* foi realizada no modelo de combinação de proporções fixas e diluição seriada (Simões-Silva et al. 2016). O fato marcante foi que metronidazol promoveu ação antiparasitária do benznidazol. Sendo metronidazol e benznidazol compostos nitroimidazólicos, esta promoção na coadministração *in vitro* pode estar relacionada ao aumento da atividade de oxidoredutases. Imidazois podem ainda interferir no metabolismo energético do parasita, especialmente na mitocôndria, induzindo fragmentação de DNA (Kumar et al. 2015), mas outros eventuais alvos não podem ser descartados. A significativa redução do EC₅₀ de benznidazol em coadministração com metronidazol indicou, portanto, a vantagem em associar os dois fármacos, justificando assim sua seguinte avaliação *in vivo*.

As análises *in vivo* em modelo murino de infecção aguda experimental por *T. cruzi*, foram inicialmente testadas em esquemas de monoterapia. Ainda que não tenha sido detectada redução da parasitemia, obteve-se aumento da sobrevivência com os tratamentos de 250 e 500 mg/Kg de metronidazol, em comparação ao grupo infectado e tratado somente com veículo. Não houve evidência de toxicidade nos animais que receberam as doses cumulativas mais elevadas de 800 e 1000 mg/Kg de metronidazol. Porém, as maiores doses resultaram em perda de solubilidade, o que pode ter influenciado na sua baixa potência ou mesmo ausência de resposta sobre a carga parasitária nos modelos de infecção *in vivo* por este parasito.

Sobre os modelos animais aqui utilizados, é importante relatar que ainda que machos e fêmeas possam divergir na resposta em ensaios de toxicidade (Lipnick et al. 1995), bem como no curso da infecção pelo *T. cruzi* (Guedes-da-Silva et al. 2015), apenas fêmeas foram selecionadas para os estudos de toxicidade aguda, uma vez que elas são mais sensíveis à variação sistêmica de concentração de medicamentos. Por outro lado, somente camundongos machos foram usados na infecção experimental e respectivo tratamento, pois neste caso eles em geral, são mais

sensíveis a infecção por este patógeno, sendo um modelo de maior estringência para a identificação de novos candidatos terapêuticos para a doença de Chagas, exibindo em geral neste roedores, maiores cargas parasitárias e menor sensibilidade a fármacos em relação a fêmeas (Guedes-da-Silva et al. 2015).

A falta de atividade de metronidazol *in vivo* em monoterapia corroborou os dados *in vitro*. Em contrapartida, visto que metronidazol influencia a atividade de benznidazol *in vitro*, avançamos para o ensaio de combinação em camundongos, almejando verificar seu impacto nos níveis de parasitemia e taxa de mortalidade. Quando administrada a dose sub-ótima de benznidazol (10 mg/kg que representa 10 % da dose padrão em nosso modelo) com as melhores doses protetoras de metronidazol (250 e 500 mg/Kg), as combinações não foram capazes de reduzir os níveis de parasitemia. Entretanto, o grupo Bz 10 + Mtz 250 alcançou maior sobrevivência (em 70 % dos animais) em relação ao grupo infectado e tratado somente com veículo. Além disso, o último esquema terapêutico protegeu também contra alterações na fisiologia elétrica cardíaca mantendo a funcionalidade cardíaca, como representado nos nossos traçados de eletrocardiograma (ECG). Enquanto isso, os animais que receberam a dose ótima de benznidazol (100 mg/kg/dia) apresentaram um expressivo bloqueio atrioventricular não observado no grupo de animais controle não tratados.

Na infecção experimental aguda por *T. cruzi*, são normalmente reportadas no ECG o bloqueio atrioventricular (BAV), bradicardia (BRA), dentre outras alterações menos frequentes (Campos et al. 2016). Nossos achados demonstraram uma leve proteção de metronidazol no presente modelo murino experimental. Apesar de não reduzir a carga parasitária, a coadministração de metronidazol resultou no controle parcial da mortalidade animal além de diminuição das alterações do perfil eletrofisiológico cardíaco quando os animais infectados foram tratados com a associação metronidazol e benznidazol, confirmando os aspectos promissores das estratégias de reposicionamento de fármacos e terapia combinada exploradas no presente trabalho. Nossos resultados alinham-se com os de Moreira da Silva e colaboradores (2012) que verificaram que a co-administração de itraconazol com benznidazol levou a um aumento no volume de distribuição e da meia-vida de benznidazol. Os autores sugerem que o mesmo pode alterar a farmacocinética de benznidazol após administração oral, e essa modificação pode ser vantajosa. É possível que um fenômeno semelhante pode ter acontecido, resultando em redução das disfunções cardíacas nos animais do grupo da combinação Bz 10 + Mtz 250 resultando no aumento de sobrevivência dos animais infectados.

Indústrias farmacêuticas e governos normalmente ignoram doenças infecciosas relacionadas a populações que vivem em áreas de extrema pobreza, fazendo delas condições negligenciadas. Estas afetam essencialmente a população pobre, e a persistência dos pesquisadores na busca de novos compostos levanta cada vez mais questões a respeito do futuro do tratamento da maioria dessas enfermidades. Essa primeira parte do estudo já enfatiza a importância do uso de diferentes abordagens para identificação de novos potenciais agentes/esquemas farmacológicos para terapia da doença de Chagas sendo elas o reposicionamento de fármacos e a terapia combinada, reafirmando metodologias bem estabelecidas em outras doenças. Nesse sentido, demonstramos que o redirecionamento de medicamentos pode ser uma alternativa executável de menor custo e maior rapidez. Mais que isso, igualmente lógico é tentar utilizar tal abordagem em combinação com outros fármacos que possam proporcionar não apenas redução dos níveis de parasitemia, mas também melhorar a qualidade de vida para os pacientes. Os dados deste estudo encontram-se publicados na revista “Biochemical Pharmacology”.

Seguindo essa linha de raciocínio, partimos para a investigação do segundo medicamento selecionado, o imatinib (IMB), que foi racionalmente desenvolvido para atender as necessidades de pacientes de uma doença órfã, a leucemia mieloide crônica (Musumeci et al. 2015). Esta enfermidade foi determinada como órfã pelo “Orphan Drug Act” em 1983, uma lei que estabelece tal denominação por ser uma enfermidade que conta com menos de 200.000 pacientes nos Estados Unidos da América. Em um estudo nesse mesmo país, os autores demonstraram a aplicabilidade de IMB para outras enfermidades incluindo tumor estromal do trato gastrointestinal, evidenciando o espectro mais amplo de imatinib em relação a células tumorigênicas e sugerindo que poderia, assim, ser direcionado para a terapia de outros tipos de neoplasias (Kesselheim et al. 2012). Estudos posteriores investigaram a potencial aplicabilidade do imatinib para diversas outras doenças, incluindo infecções por helmintos, como filariose e esquistossomose (Beckmann et al. 2014; Buro et al. 2014; O’Connell et al. 2015), e por protozoários causadores de leishmaniose, tripanossomíase africana e malária (Behera et al. 2014; Pathak et al. 2015; Wetzel et al. 2012), indo em direção a proposta do reposicionamento farmacológico de imatinib como elemento antiparasitário.

Como mencionado na introdução da presente tese, imatinib é um inibidor seletivo da tirosina cinase (TK), uma enzima presente na maioria das células tumorigênicas e que atua na fosforilação de substratos proteicos (ex. outras enzimas), transdução de

sinais (regulação da expressão gênica), além de processos essenciais, por ex. diferenciação, replicação, proliferação e morte celular (Manley et al. 2002). A função da TK em tumores (como os estromais gastrointestinais), encontra-se ativada, promovendo o controle da apoptose e proliferação, bem como da quimiotaxia e adesão celular, culminando na formação dos tumores (Moreno et al. 2010). Outros alvos do imatinib já descritos incluem o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e o receptor do fator de crescimento de células tronco (KIT) (Cruz-Rico et al. 2013; Musumeci et al. 2015). Além disso, TKs também estão expressas em protozoários, por ex. nos tripanossomatídeos, incluindo o *T. cruzi*, sendo muito importantes em processos metabólicos e de vias de sinalização e invasão celular (Melo et al. 2014). A atividade moderada de imatinib sobre *Plasmodium falciparum* (Pathak et al. 2015) e *Leishmania amazonensis* (Wetzel et al. 2012) foi descrita, e sua correlação com a inibição enzimática da TK e outras cinases demonstrada. Entretanto, imatinib foi inativo sobre *T. brucei gambiense*, ainda que alguns análogos tenham apresentado algum efeito tripanossomicida (1,3 – 2,5 µM). Dentre eles, os autores ressaltam o lapatinib (Behera et al. 2014) que foi usado como base para o desenho de novas moléculas testadas em *L. major*, *T. brucei* e mesmo *T. cruzi* com resultados promissores *in vitro* (por ex. a molécula derivada NEU-1045 apresentou EC₅₀ de 0,37 µM em *T. brucei*, 1,2 µM em *L. major* e 2,8 µM em *T. cruzi*) (Devine et al. 2017). Um aspecto positivo do imatinib é o seu favorável perfil farmacocinético (tempo de ½ vida de 18 horas, 400 – 800 mg por dia com segurança em tratamento prolongado), como reportado por outros autores (Cruz-Rico et al. 2013; Musumeci et al. 2015; Rix et al. 2007).

Na presente tese, avaliamos a possível atividade tripanossomicida de imatinib e derivados em comparação ao benznidazol, utilizando as diferentes metodologias *in vitro* bem estabelecidas para a triagem em *T. cruzi* como já acima comentadas (Romanha et al. 2010). O perfil de toxicidade foi avaliado sobre dois tipos diferentes de células de mamíferos (células cardíacas primárias e fibroblastos de linhagem L929, ambas de camundongos), e a potência deste fármaco estudada sobre formas do parasita relevantes para a infecção humana (amastigotas e tripomastigotas). Os parasitas foram obtidos de diferentes fontes (cultura e sangue) e distintas cepas representativas de diferentes DTUs (Y/DTU II e Tulahuen/DTU VI) incluindo aquelas que são naturalmente resistentes a nitroderivados, como recomendado no fluxograma para triagem de compostos para a doença de Chagas (Romanha et al. 2010; Zingales et al. 2012).

O programa de treinamento em pesquisa de doenças tropicais da OMS (em inglês, TDR – Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases, World Health Organization) estabelece critérios para a determinação de atividade antiparasitária e seletividade de compostos em teste sobre o agente da doença de Chagas: aqueles com EC_{50} menor que $4,0 \mu\text{M}$ são considerados ‘ativos’, entre $4,0$ e $60 \mu\text{M}$ são ‘moderadamente ativos’, e maiores que $60 \mu\text{M}$ são classificados como ‘inativos’ quando testados sobre amastigotas de *T. cruzi* (Papadopoulou et al. 2015). Em concordância, ainda que imatinib tenha apresentado atividade moderada ($\leq 60 \mu\text{M}$) sobre as diferentes formas e cepas do parasita e com valores de EC_{50} cerca de seis vezes maiores que o benznidazol sobre as formas intracelulares e sanguíneas, a seguinte etapa do nosso estudo que foi conduzida com 14 novos derivados de IMB revelou que alguns deles (**1a**, **2b**, **2d**, **3c** e **3e**) apresentaram notável aprimoramento de atividade anti-*T. cruzi*, alcançando o mais efetivo, o composto **3c**, EC_{50} de $2 \mu\text{M}$ após 96 horas de incubação com formas intracelulares da cepa Tulahuen. Os quatorze derivados estão agrupados em três series desenvolvidas a partir de imatinib e sunitinib, outro inibidor de TK utilizado no tratamento de carcinoma celular renal e tumores estromais do trato gastrointestinal (Moreno et al. 2010). Todos os compostos aqui estudados têm o grupo fenilamino-pirimidina como seu fragmento farmacofórico principal. A série **1a-e** tem híbridos entre sunitinib e imatinib. Isatinas foram usadas como ponto de partida na síntese das três séries; **2a-e** têm 2-oxo-2-fenilacetamidas e **3a-e** têm 3,2-difloro-2-fenilacetamidas (Azevedo et al. 2017). Algumas destas moléculas já haviam sido analisadas sobre culturas de células tumorais e os autores reportaram o efeito antitumoral *in vitro* sobre linhagens K562 e WSS-1 e sugeriram a importância do grupo 2-oxo-2-fenilacetamida em **2a-e** para sua atividade biológica (Azevedo et al. 2017). O mesmo grupo relatou que as séries **3a-e** (2,2-difloro-2-fenilacetamidas) e **1a-c** (iminas) resultaram em perda de viabilidade sobre a linhagem K562. Nessa publicação, o composto **2d** ($0,37 \mu\text{M}$) foi equipotente a imatinib ($0,21 \mu\text{M}$), seguido de **2e** ($0,56 \mu\text{M}$), **2b** ($0,86 \mu\text{M}$) e **2a** ($2,02 \mu\text{M}$), demonstrando uma redução significativa da viabilidade celular (Azevedo et al. 2017). No presente trabalho, nossos dados a respeito da atividade tripanossomicida em amastigotas da cepa Tulahuen em células da linhagem L929 demonstraram que as moléculas **2a**, **2b**, **2d** e **2e** ($EC_{50} < 10 \mu\text{M}$) foram mais potentes que imatinib ($EC_{50} = 38,3 \mu\text{M}$). É importante notar que as melhores moléculas contra *T. cruzi* (**3d** e **3e**), não foram tumorigênicas em estudos anteriores utilizando linhagens tumorais (Azevedo et al. 2017). Além disso, as iminas **1a-c** também não apresentaram nenhum efeito

tripanossomicida, como demonstrado previamente utilizando a linhagem celular K562. Portanto, é possível demonstrar que alguns dos derivados de imatinib ora testados tiveram uma promoção de sua potência sobre o agente causador da doença de Chagas (De Rycker et al. 2016; Devine et al. 2017). Importante destacar que os compostos **1a**, **2a-e**, **3a** e **3c-e** apresentaram ação tripanossomicida $< 10 \mu\text{M}$ sobre as formas intracelulares da cepa Tulahuen.

Estudos com *T. brucei* revelaram que imatinib é menos seletivo para TK de tripanossomatídeos em relação a outros análogos comerciais, como o nilotinib e o lapatinib (Behera et al. 2014). É possível que os derivados de imatinib aqui testados possam ser talvez mais seletivos para TKs do parasito, o que precisa ser futuramente estudado.

Outra hipótese que pode ser levantada é que as pequenas alterações estruturais no desenho dos novos derivados de imatinib aqui estudados possam ter alterado a afinidade destes novos compostos para outros alvos celulares do parasita, resultando assim nos “*whole cell-based assays*” num incremento de atividade de algumas sobre *T. cruzi* (potência na faixa micromolar), o que representa um relevante aprimoramento na atividade tripanocida em relação a imatinib e lapatinib, correlacionando com dados anteriores (Devine et al. 2017).

Ainda que potentes contra *T. cruzi*, esses novos derivados necessitam ser otimizados visando alcançar propriedades físico-químicas desejáveis para novos protótipos de fármacos (por ex. solubilidade e elevado peso molecular, dentre outras), visando promover sua seletividade e janela terapêutica sobre as células de mamíferos. Assim, a otimização pode viabilizar a obtenção de melhores características de “drogabilidade” dentro do perfil de produto alvo para doença de Chagas.

A seguir, investigamos se IMB poderia interagir e promover a atividade tripanossomicida do benznidazol quando administrados concomitantemente. O ensaio de combinação entre esses dois medicamentos apresentou perfil de aditividade de acordo com os valores obtidos pelos ΣFICIs (somatório das frações do índice de concentração inibitória de cada fármaco). Não obstante, os valores de FICI diferiram entre as proporções, revelando que a proporção entre duas partes de imatinib com três partes de benznidazol foi a que obteve melhor resultado e poderá ser mais promissora nos ensaios *in vivo*. Outro aspecto interessante foi o perfil de baixa toxicidade da combinação IMB + Bz. A viabilidade das células L929 caiu para 91 % apenas quando maiores concentrações de IMB foram utilizadas, como 200 μM IMB +

4,4 μM Bz. Ainda assim, a estratégia de combinar compostos que apresentem distintos mecanismos de ação representa uma relevante estratégia terapêutica, haja vista que pode permitir alcançar efeito sobre alvos divergentes, melhorando o potencial de eliminar o parasita em um menor período de exposição aos compostos e com doses não tóxicas.

Assim, o foco desse segundo estudo foi investigar o perfil fenotípico (atividade biológica e toxicidade) de imatinib e de 14 novos derivados, e novos achados argumentam mais uma vez a favor das estratégias que nos propusemos a testar. O reposicionamento e a combinação provêm tratamentos alternativos para doenças negligenciadas de modo mais rápido e econômico enquanto ainda não se encontra a pílula dourada. Além disso, validamos a estratégia de triagem fenotípica de novos compostos como método proficiente para a química medicinal, almejando maior seletividade com o alvo do parasita e menor perfil de toxicidade para células mamíferas, visando no futuro contribuir para descoberta de novos esquemas terapêuticos que possam suprir as necessidades dos afetados pela doença de Chagas. Os dados deste estudo encontram-se compilados e submetidos à publicação na revista "Parasitology".

No estudo a seguir, elegemos mais um medicamento para testar o reposicionamento de fármacos como alternativa terapêutica para doença de Chagas: o levamisol (Lms). O uso do levamisol como anti-helmíntico teve início no começo da década de 1960, tendo sido testado como agente imunotrópico desde a década de 1970 (Amery e Bruynseels 1992). O medicamento foi avaliado em ensaios clínicos, por ex., como terapia adjuvante de câncer cólon-retal, sendo seu uso mais tarde sugerido para a prática devido aos positivos resultados obtidos (Mutch e Hutson 1991). O efeito benéfico contra protozoários também já foi demonstrado em pacientes com leishmaniose cutânea crônica (Butler 1982), bem como em leishmaniose visceral experimental, seja administrado em monoterapia ou combinação (Rezai et al. 1988; Rifaat et al. 1989). Em camundongos experimentalmente infectados com *Toxoplasma gondii*, levamisol foi associado ao tratamento padrão sulfadiazina + pirimetamina, demonstrando seu efeito imunopotenciador, segundo os autores, ao prolongar o tempo de vida dos animais que o receberam em comparação aos que receberam apenas a terapia preconizada sem levamisol (Köksal et al. 2016).

Direcionados pelos dados prévios da literatura acerca das descrições do uso de levamisol, utilizamos técnicas e modelos validados de infecção murina aguda de *T. cruzi* para avaliar as potenciais atividades antiparasitárias e imunoduladoras deste

medicamento utilizando diferentes protocolos terapêuticos, contemplando a possibilidade de reposicionamento a partir de sua administração em monoterapia ou em combinação ao fármaco de referencia para a doença de Chagas, o benznidazol.

Assim, para autenticar nossos métodos, o tratamento padrão de benznidazol em doses ótima e sub-ótima (já empregado anteriormente pelo grupo e no presente trabalho) foi conduzido em paralelo avaliando parâmetros parasitológicos (ex. parasitemia) e clínico (sobrevida dos animais), sendo comparado a grupos controles de animais não infectados e infectados, porém não tratados. Benznidazol na dose ótima (100 mg/Kg) mostrou, como já reportado, eficácia antiparasitária, o que não foi observado com benznidazol na dose sub-ótima (10 mg/Kg), corroborando dados publicados (Simões-Silva et al. 2017). A supressão da parasitemia obtida com benznidazol 100 mg/kg pode resultar numa resposta inflamatória e imune específica menos agressiva e mais equilibrada diferentemente ao ambiente desbalanceado e altamente pró-inflamatório existente em animais infectados e não submetidos ao tratamento etiológico haja vista que a elevada carga parasitária nestes animais pode resultar em lesões teciduais decorrente da lise de células hospedeiras pelos próprios parasitas e/ou pelas células inflamatórias continuamente atraídas para os sítios de infecção causando importantes danos, e perdas funcionais. Entretanto, apesar de não termos conduzido estudos quantitativos e qualitativos *in situ* (ex. no coração) acerca do perfil e natureza das células inflamatórias e seus mediadores, nossos dados mostram que curiosamente, a administração da dose sub-ótima de benznidazol (10 mg/kg) resultou numa expressão semelhante de mediadores pró e anti-inflamatórios presentes no sangue periférico dos animais infectados e tratados com doses ótimas (100 mg/kg). Estes achados sugerem a ausência de correlação direta entre intensidade e natureza da resposta inflamatória sistêmica e o controle da carga parasitária nos modelos de infecção experimental por *T. cruzi*. Essa observação corrobora achados prévios de que a eficácia do tratamento com benznidazol da infecção aguda por *T. cruzi* é constituída pelo efeito tripanossomicida direto sobre o agente etiológico sem que haja correlação direta com a resposta imune do hospedeiro (Ferraz et al. 2007).

A literatura descreve que levamisol possui atividade antiparasitária e imunomoduladora sendo que cada mecanismo de ação é direcionado pelas doses que variam de 7,5 a 1,8 mg/kg (Risvanli & Aydin 2003). Entretanto, alguns aspectos são igualmente importantes, incluindo a frequência apropriada do tratamento, o doseamento adequado, e o estado imune do hospedeiro. O uso de levamisol deve ser

sempre primária e indispensavelmente avaliado em indivíduos saudáveis, no que diz respeito a ensaios pré-clínicos e clínicos, almejando evitar recorrências desvantajosas (Brunner e Muscoplat 1980). De fato, aqui, ainda que tenhamos demonstrado que até 100 mg/Kg por via oral nenhum efeito colateral tenha sido evidenciado, a administração intraperitoneal (ip) de doses altas (≥ 50 mg/Kg) induziu morte súbita em animais saudáveis (um de dois) e dos infectados por *T. cruzi* (cinco de cinco) (dado não apresentado no artigo). Em animais não infectados e tratados com levamisol não foram encontradas alterações em testes hematológicos (hemograma completo), em comparação aos não tratados. A análise patológica no ato da necropsia demonstrou aspectos hemorrágicos no pulmão além de alterações na morfologia hepática (alteração da cor do órgão), o que pode ser sugestivo de vasculite ou coagulação intravascular disseminada (dado não apresentado). Efeitos colaterais similares foram reportados em usuários de cocaína adulterada com levamisol nos EUA (Fredericks et al. 2017). Efeitos deletérios de levamisol também foram descritos em modelo de tripanossomíase africana experimental que utilizou diferentes cepas de camundongos, demonstrando aumento de mortalidade em animais mais suscetíveis (Libeau e Pinder 1981). Em 1980, Renoux abordou questões gerais da imunofarmacologia de levamisol, afirmando que este medicamento pode ser um agente imunoestimulante ou imunossupressor a depender da dose utilizada, e que, portanto, diversos efeitos podem ser esperados de acordo com a metodologia empregada (ou seja, o desenho experimental, a posologia e o modelo da doença estudada).

Estudos anteriores com infecção experimental por *T. cruzi* (cepa Y, camundongos Swiss Webster) mostraram que o tratamento profilático com levamisol por dez dias reduziu a parasitemia em cerca de 50 % em relação aos animais infectados, mas não tratados, reduzindo também a mortalidade (cerca de 10 %) (Abath et al. 1988). A administração alternativa por via subcutânea durante os dez primeiros dias de infecção não interferiu nos níveis de parasitemia em comparação a animais infectados e não tratados, apresentando, inclusive, mortalidade semelhante (Abath et al. 1988). Em nossos ensaios, a administração de dose única de Lms previamente à infecção, seguida por tratamento de cinco dias iniciado no 5º dia pós-infecção (5º dpi, que corresponde neste modelo a positividade da parasitemia detectável em exame de sangue a fresco nesse modelo experimental) não foi capaz de reduzir os níveis de parasitemia. Em todos os grupos tratados com levamisol houve exacerbação da

parasitemia, e a dose única pré-infecção não causou maiores influências no resultado, quando comparado aos grupos sem pré-tratamento.

Assim, observamos que levamisol administrado em esquema de monoterapia (início no 5º dpi) demonstrou que o medicamento não foi capaz de reduzir a parasitemia com as doses administradas (10, 5 e 1 mg/Kg, via ip ou oral), e que abrangiam a faixa descrita na literatura desde a atividade antiparasitária até a ação imunomoduladora (Risvanli e Aydin 2003). De fato, o tratamento aumentou a parasitemia em 13 a 146 % em comparação ao grupo controle infectado não tratado (dado não apresentado). O aumento da parasitemia foi também descrito para camundongos infectados com *T. (nanomonas) congolense* e tratados com levamisol (Libeau & Pinder 1981).

Os protocolos de combinação utilizando a dose sub-ótima de benznidazol (10 mg/Kg) e diferentes doses de levamisol revelaram que, dentre os esquemas terapêuticos avaliados, a proporção de Lms 1 + Bz 10 diminuiu a parasitemia em cerca de 30 % em relação ao grupo controle infectado não tratado. Essa combinação foi ainda mais eficaz que as respectivas monoterapias com Lms 1 mg/kg e Bz 10 mg/kg. A análise de citocinas plasmáticas mostrou que Lms 1 mg/kg (dado não apresentado) e Bz 10 mg/kg reduzem de modo semelhante os níveis dos mediadores estudados (IFN- γ , IL-6, TNF e IL-10), apresentando níveis menores que o grupo infectado não tratado. Em contraste, o esquema terapêutico Lms 1 mg/kg + Bz 10 mg/kg induziu um ambiente inflamatório com aumentos significativos dos níveis de IFN- γ e IL-6 em comparação a todos os outros grupos. Como consta na literatura, cepas de camundongos que são suscetíveis ou resistentes a *T. cruzi* demonstram elevada produção de IFN- γ durante a infecção aguda (Morato et al. 1998; Nabors e Tarleton 1991), e isso também foi observado nos nossos presentes estudos. O fato de que o tratamento combinado aumentou a produção de IFN- γ em comparação às monoterapias, estendendo a sobrevivência e reduzindo a parasitemia, pode sugerir uma possível interação entre levamisol e benznidazol nas doses definidas acima. Tal interação pode estar promovendo a resposta imune do tipo Th1, o que resulta em controle da carga parasitária mais eficiente.

A respeito da expressão de IL-6, este mediador está elevado em tecidos parasitados e na circulação de animais experimentalmente infectados, bem como na infecção humana (Chandrasekar et al. 1996; Truyens et al. 1994). IL-6 desempenha um importante papel na resistência contra infecção por *T. cruzi* em modelo murino, mostrando que pode influenciar também a diferenciação de células T específicas do

antígeno, podendo até mesmo ser correlacionada à cinética de expressão de IFN- γ (Gao e Pereira 2002). IL-6 não reduz os níveis parasitários, e sua elevada expressão transitória durante o início da infecção pode prolongar a sobrevivência dos animais (Truyens et al. 1994). A indução da expressão de IL-6 pela combinação Lms 1 mg/kg + Bz 10 mg/kg pode indicar uma regulação positiva da resposta específica contra *T. cruzi* no nosso modelo.

Ainda em relação à carga parasitária, uma maior supressão da parasitemia (60%) foi obtida utilizando o esquema terapêutico Lms 0,5 mg/kg + Bz 10 mg/kg. Análises de qPCR revelaram que este tratamento reduziu a parasitemia no sangue em torno de 10 vezes em comparação ao tratamento padrão com Bz 100 mg/kg. Esse resultado pode indicar que quanto menor a dose de levamisol, melhor o efeito da combinação com benznidazol, mas isso precisa ser posteriormente verificado.

Nossos resultados sugerem, portanto, que levamisol pode ser futuramente investigado quanto ao seu papel imunopotenciador de benznidazol, uma vez que essa representa uma estratégia relevante em casos de comorbidades, coinfeções e/ou reativação da doença de Chagas. De todo modo, ensaios nesse contexto devem ser plenamente realizados considerando o uso de diferentes cepas de camundongos e *T. cruzi*, com rigoroso controle da posologia.

Os efeitos aqui observados com levamisol evidenciam a importância de se conduzir novos ensaios pré-clínicos com fármacos que sejam novos potenciais candidatos para o reposicionamento, mesmo que já sejam medicamentos consolidados no mercado, uma vez que podem ser benéficos ou prejudiciais ao hospedeiro e, em uma maior escala, ao paciente diante de uma enfermidade. Atenção especial deve ser dada às interações medicamentosas que podem apresentar efeitos surpreendentes diante de um estado imune alterado do hospedeiro. Fundamentalmente, é preciso considerar que indivíduos infectados com o *T. cruzi* são normalmente diagnosticados na fase crônica tardia, quando são adultos mais velhos que requerem medicamentos para outras comorbidades associadas ou não à doença de Chagas. Assim, o tratamento deve ser bem planejado para evitar consequências indesejadas.

Reiterando sobre o reposicionamento de medicamentos e combinação, sabe-se que tais estratégias têm sido extensamente usadas em farmacologia experimental para muitas doenças, não apenas doença de Chagas, com resultados bem sucedidos que determinam a posterior aplicação para usos clínicos, como por exemplo o caso do reposicionamento do nifurtimox e subsequente combinação com a eflornitina para o

tratamento de tripanossomíase africana (Sun et al. 2016; Alirol et al. 2013). Isso é possível quando fármacos compartilham alvos comuns em diferentes organismos; entretanto, a seletividade pode mudar de acordo com o patógeno em correlação ao hospedeiro mamífero, e seu impacto precisa ser criteriosamente avaliado (Oprea e Mestres 2012). Por exemplo, alguns compostos fungicidas que atuam como inibidores seletivos da enzima CYP 51 de *T. cruzi* foram identificados e até submetidos a ensaios clínicos (posaconazol e E1224). Porém, nenhum resultado promissor tenha sido alcançado devido às altas taxas de falha terapêutica nos ensaios clínicos (Morillo et al. 2017; Torrico et al. 2018). Além disso, o ensaio BENEFIT demonstrou que, apesar de ter sido eficaz em reduzir a carga parasitária em pacientes crônicos tratados, benznidazol não conseguiu impedir a progressão dos danos cardíacos, reforçando a necessidade da busca de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas (Rassi et al. 2017). Os dados deste estudo encontram-se compilados e submetidos à publicação na revista “Parasitology”.

Nesse contexto, introduzimos nosso quarto estudo, a análise fenotípica sobre *T. cruzi* de inibidores da rota sintética de lipídios previamente identificados por modelos matemáticos (Fügi et al. 2015). Assim, foram avaliadas *in vitro* o seu potencial tripanocida, determinando a respectiva seletividade em relação ao hospedeiro mamífero. Dois compostos “hit” foram encontrados e seguidamente testados em esquemas de combinação. A associação mais promissora foi conseqüentemente investigada *in vivo* por meio de modelos murinos validados de infecção aguda experimental por *T. cruzi* (Romanha et al. 2010).

Os primeiros ensaios foram conduzidos utilizando formas proliferativas do parasita: epimastigotas e amastigotas intracelulares, presentes nos hospedeiros invertebrado e vertebrado, respectivamente (Tyler & Engman 2001). Nossos resultados mostraram que seis dos 15 inibidores apresentaram efeito moderado sobre os epimastigotas, mas apenas quatro foram tão potentes quanto benznidazol quando testados nas formas intracelulares. Dois deles apresentaram os maiores IS (IS > 10) e foram movidos para ensaios de combinação: Ro48-8071 (IS = 13,7) e cloridrato de tomatidina (TH) (IS = 41,2). As diferenças no EC₅₀ observadas para um mesmo composto sobre as duas formas do parasita aqui investigadas (por ex., TH inativa contra epimastigotas, mas muito ativa contra amastigotas intracelulares) pode ser explicada pelas diversas características intrínsecas a cada forma, não apenas em relação ao metabolismo correlacionado aos distintos microambientes que cercam cada forma do parasita (hospedeiro invertebrado *versus* vertebrado), mas também no

que diz respeito às potenciais diferenças nos mecanismos de resistência a medicamentos existentes entre as formas e cepas, cujos alguns aspectos já previamente reportados (Zingales et al. 2012, 2014). Esses dados sustentam a importância de se realizar busca de novos fármacos contra formas proliferativas relevantes para o hospedeiro mamífero (as amastigotas), confirmando que não se pode determinar uma correlação direta pelo teste em epimastigotas (De Castro et al. 2011; Romanha et al. 2010).

Combinações entre os compostos foram, então, preparadas em proporções fixas como descrito na literatura (Simões-Silva *et al.* 2016), e as associações foram testadas em amastigotas intracelulares (presentes na infecção de células de linhagem L6) em conformidade aos protocolos anteriores (para os ensaios de atividade). A respeito da seleção de medicamentos para serem coadministrados com os dois “hits” identificados foram: o benznidazol que é o fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas, sendo, portanto, uma escolha óbvia para os protocolos de combinação no presente trabalho (Coura 2009). Posaconazol e fexinidazol que são dois agentes já bem estabelecidos como potentes moléculas anti-*T. cruzi in vitro* e *in vivo* (Urbina 2010) e já foram movidos para ensaios clínicos para a doença de Chagas (Bahia et al. 2012; Morillo et al. 2017; Portfólio do DNDi 2018). Assim, TH e Ro48-8071 foram combinados a benznidazol, posaconazol e fexinidazol, e a interação classificada de acordo com os valores de Σ FICI. Esquemas feitos com Ro48-8071 mostraram aditividade e até mesmo antagonismo, sendo descartados para os seguintes ensaios *in vivo*. Combinações de benznidazol e fexinidazol com TH foram também aditivas, mas, surpreendentemente, a interação com posaconazol foi essencialmente sinérgica, apresentando Σ FICI = 0,2. Esse tipo de interação foi descrito anteriormente para a administração concomitante de TH com antibióticos aminoglicosídeos, sendo mais eficiente em inibir o crescimento da colônia de *Staphylococcus aureus* (proveniente de isolados clínicos) que a respectiva terapia padrão (Mitchell et al. 2011, 2012; Soltani et al. 2017).

A partir desse ponto, a combinação de Posa + TH foi direcionada para os protocolos *in vivo*. TH foi testada anteriormente em camundongos saudáveis (normais e grávidas) como suplemento na dieta, apresentando nenhuma toxicidade (Friedman et al. 2003). Contudo, este não é o método ideal para se determinar a posologia de um composto ativo, uma vez que impede a correlação entre efeitos observados e quantidade real ingerida por cada animal. Além disso, de acordo com a literatura encontrada, não há estudos descrevendo doses para o tratamento *in vivo*. Assim, na

presente tese, a toxicidade animal aguda foi o primeiro conceito avaliado em modelo murino. Nosso ensaio mostrou que TH pode ser administrada por via oral até 200 mg/Kg sem qualquer dano aparente de natureza clínica, hematológica ou bioquímica aos animais (dados não apresentados).

A seguir, a atividade antiparasitária de TH foi investigada e demonstrou-se que esta molécula isolada (doses de 5 a 0,5 mg/kg) não foi eficaz. As combinações, entretanto, foram capazes de reduzir a parasitemia em níveis comparáveis aos de monoterapia com Posa 1,25 mg/kg, sendo a melhor associação aquela cuja proporção foi de Posa 1,25 mg/kg + TH 3,75 mg/kg, uma vez que apresentou melhor taxa de sobrevivência animal em comparação aos outros tratamentos, sendo mesmo maior que Posa 10 mg/kg sozinho. Esta proporção corresponde aquela administrada *in vitro* na qual observamos o maior grau de sinergia (mesma proporção entre os compostos, 1:3, respectivamente).

TH foi testada anteriormente em outros tripanossomatídeos, sendo eles *Phytomonas serpens* e *L. amazonensis*, e os mecanismos de ação sugeridos seriam a inibição da enzima tripanotiona redutase (Argüelles et al. 2016) e/ou a inibição da biossíntese de esteróis (Medina et al. 2012, 2015).

O interesse desse estudo se baseou em encontrar “hits” *in vitro* que pudessem alcançar etapas *in vivo*, além de contribuir para a produção de conhecimento sobre novas moléculas (em monoterapia ou em combinação) para a configuração de tratamentos alternativos contra a infecção por *T. cruzi*. O proeminente composto identificado, TH, é uma substância sintética originalmente encontrada em tomates que possui uma ampla descrição de seus efeitos antioxidantes, anticarcinogênicos e antimicrobianos, bem como outras moléculas da família de plantas Solanaceae (Friedman 2013). Até onde sabemos, este é o primeiro relato do uso da TH em doença de Chagas experimental, e os resultados de combinação aqui apresentados são encorajadores, não apenas para estudos futuros com essa classe de compostos, mas também para o emprego de protocolos de reposicionamento e combinação. Estas abordagens representam estratégias validadas que podem viabilizar redução de custo e tempo na pesquisa para novos tratamentos alternativos para a doença de Chagas, sendo estes aspectos de suma relevância dada a falta de interesse em tais estudos que beneficiam populações carentes afetadas por esta silenciada doença.

Além de todos os esforços empregados na busca de novas alternativas terapêuticas para a doença de Chagas, é igualmente fundamental investigar o impacto de comorbidades, pois a sobreposição de doenças é frequente em regiões de

pobreza, sobretudo com a demonstrada a coexistência de doenças negligenciadas em zonas tropicais. Somado a esse cenário, a condição anteriormente exposta do momento de eventual diagnóstico do indivíduo portador de *T. cruzi*, normalmente a fase crônica tardia da doença, em que o paciente já tem idade mais avançada e pode apresentar outras enfermidades associadas ou não à doença de Chagas. Esses aspectos não são frequentemente abordados, mas com a crescente globalização e urbanização da doença de Chagas, coinfeções se tornam realidades silenciosas que podem impactar em seu curso e tratamento.

O modelo atualmente descrito avaliou o impacto de uma comorbidade helmíntica na doença de Chagas experimental aguda e o curso de tratamento etiológico com o fármaco padrão benznidazol. Para começar, os grupos Tc demonstraram parasitemia característica e taxas de mortalidade conforme relatado anteriormente para a infecção por cepa Y em camundongos Swiss Webster (Simões-Silva et al. 2017). Em nossos modelos de camundongos Sm, os diferentes estágios do verme foram observados, incluindo as formas adultas (macho e fêmea, em casal ou sozinhos) e o granuloma no fígado, e até mesmo nas amostras cardíacas, com a liberação de ovos detectados nas fezes dos animais.

Camundongos previamente infectados com Sm por 30 dias, que correspondem a infecção helmíntica anterior, e inoculados com Tc, apresentaram comportamento semelhante ao descrito acima. No entanto, quando o outro modelo foi empregado e que corresponde a uma infecção esquistossomótica tardia (Tc + Sm₂), foi detectada parasitemia exacerbada em comparação com o Tc sozinho. Esses resultados corroboraram achados prévios (Kloetzel et al. 1973; Rodrigues et al. 2017) que descreveram a exacerbação da parasitemia em camundongos inoculados com Tc durante uma infecção crônica por Sm. O primeiro trabalho sugeriu uma possível correlação com os eventos imunes, mas nenhum outro teste foi realizado nesse momento (Kloetzel et al. 1973). Entretanto, o segundo estudo demonstrou o envolvimento da resposta imune do hospedeiro, com a sobreposição dos padrões imunológicos Th2 (esquistossomose) e Th1 (doença de Chagas) modificando a resistência do hospedeiro contra ambos os patógenos (Rodrigues et al. 2017). É possível que o aumento do parasitismo do sangue Tc encontrado atualmente em nosso modelo de coinfeção Sm₂ tardio também seja devido a uma mudança na resposta imune do hospedeiro, do perfil Th1 a Th2, como sugerido por Rodrigues et al. (2017), levando a um controle menos efetivo da carga parasitária durante esta coinfeção. Entretanto, nossas análises de citometria de fluxo não demonstraram

alteração significativa nas populações efetoras de perfis TCD4 e TCD8 entre os animais Tc e coinfectados, embora para a memória efetora, os coinfectados apresentaram um aumento no percentual de TCD4 em comparação com Tc isoladamente. Como outros parâmetros imunológicos não foram avaliados, novos estudos são necessários para esclarecer essa questão.

Em continuidade, os achados do ECG demonstraram que Tc e Sm1 apresentaram alterações semelhantes (bloqueio atrioventricular – BAV, e bradicardia - BRA), mas os camundongos Tc apresentaram maior incidência desses distúrbios como já descritos neste modelo experimental (Campos et al. 2016). Posteriormente na infecção, Sm2 apresentou regressão total das alterações elétricas, com sistema de condução cardíaca preservado. As alterações cardíacas observadas nos grupos Sm1 (infecção recente), mas não nos grupos Sm2 (tardia) poderiam estar relacionadas ao próprio ciclo do verme. Durante a fase inicial da infecção Sm, os vermes têm um ciclo sistêmico necessário para a maturação com passagem através dos órgãos, particularmente coração e pulmão, podendo, portanto, causar danos transitórios que podem ser resolvidos na fase mais tardia da doença, quando os vermes adultos se estabelecem no espaço portal hepático e nas vênulas do intestino delgado (Prata 1978). Além disso, uma vez que um granuloma cardíaco foi encontrado em um animal, nós não podemos descartar a possibilidade de sua interferência na fisiologia do coração.

Por outro lado, Tc + Sm apresentou menor incidência de camundongos com arritmias cardíacas, com a extensão do insulto cardíaco correlacionado à fase de infecção Sm. Assim, a comorbidade em uma fase posterior da infecção pelo Sm reduz a gravidade das arritmias induzidas em doença de Chagas experimental aguda, mas parece envolver outro mecanismo não relacionado à carga parasitária, uma vez que não se correlaciona com os níveis de parasitemia e, portanto, possivelmente a resposta imune poderia desempenhar um papel que precisa ser mais profundamente avaliado.

Quanto ao tratamento com benznidazol por via oral por cinco dias, sendo de 5 a 9 dpi de Tc empregando protocolo terapêutico bem padronizado (Simões-Silva et al. 2017), constatamos que benznidazol promoveu a mesma redução na carga do parasita sanguíneo em todos os camundongos tratados, demonstrando que a coinfeção não pareceu constituir um problema para a eficácia da droga. Mesmo em Tc + Sm2 que a parasitemia foi encontrada para ser exacerbada, benznidazol suprimiu 100% da carga parasitária. Corroborando o efeito sobre a parasitemia, houve uma

proteção sobre os danos cardíacos, visto que no tratamento houve menor incidência de arritmias em grupos tratados coinfetados do que não tratados. A proteção do coração foi descrita antes pelo uso de compostos tripanossomicidas em camundongos infectados com Tc aguda (De Souza et al. 2005), e presentemente foi demonstrado que uma coinfeção por helminto não interfere no papel de benznidazol não somente na supressão do parasitemia, mas também em relação às perturbações cardíacas eletrofisiológicas.

Ainda de acordo com os dados descritos acima, as análises histológicas mostraram o ambiente melhorado do tecido cardíaco durante o tratamento. benznidazol protegeu contra a infecção, uma vez que a análise por microscopia de luz revelou uma grande diminuição dos ninhos de amastigotas e inflamação no coração, não importando o momento da coinfeção helmíntica.

Embora os resultados a respeito do tratamento na coinfeção fossem até o momento compatíveis, os protocolos da citometria do fluxo demonstraram alguns resultados distintos. Com exceção das células de memória efectoras, a análise das populações TCD4 e TCD8, em geral, revelou que a coinfeção teve uma resposta imune semelhante à de animais mono infectados com Tc e, assim, esperava-se que a administração de benznidazol reverteria os eventos da mesma forma para todos os grupos, e isso aconteceu de fato para Tc + Bz e Tc + Sm1 + Bz. O tratamento de Tc + Sm2, porém, não foi capaz de restaurar totalmente os eventos imunes aos níveis observados para Tc + Bz. O tratamento da coinfeção tardia aparenta ter exercido menor influência na resposta imune relacionada às células TCD8 efectoras e às células de memória TCD4 efectoras. Este tipo de evento, apesar da eficácia de benznidazol mostrar-se não ser afetada em muitos aspectos, deve ser levado em consideração ao lidar com pacientes, especialmente aqueles com outras comorbidades parasitárias conhecidas que visam evitar a falha terapêutica, já que o status imune do hospedeiro pode certamente influenciar a resultados terapêuticos.

A sobreposição de doenças em regiões tropicais, principalmente em áreas carentes, exige uma atenção especial dos formuladores de políticas de saúde e dos profissionais de saúde, uma vez que as tendências epidemiológicas estão em constante transformação (Hotez 2018). A doença de Chagas foi espalhada a outros continentes devido à migração global, sendo os casos importados uma realidade atual nos países que não estão ainda preparados para seu controle e avaliação/acompanhamento do paciente (Gascon et al. 2010). Além disso, houve mudanças nos padrões de transmissão em áreas endêmicas tradicionais, como por

exemplo na Amazônia brasileira há a crescente infecção oral por ingestão de alimentos contaminados (Coura et al. 2014). A dinâmica da doença de Chagas transformou-se de rural para mais urbana, e isso veio junto com comorbidades. Atualmente, é frequente observar casos de coinfeção com HIV, *Mycobacterium* e *Leishmania* em vários países latino-americanos, incluindo Brasil, Colômbia e Argentina (Hoyos et al 2016; Villamil-Gómez et al 2016; Stauffert et al 2017). O impacto para os pacientes é avaliado em muitos aspectos, por ex., terapêutico e clínico. Em relação ao tratamento, a decisão de qual doença abordar primeiro é complexa, ou mesmo se ambas devem ser tratadas ao mesmo tempo com menos desvantagens ao paciente quanto possível. Além disso, ao medicar um indivíduo para doenças diferentes, atenção deve ser dada ao risco de interação medicamentosa, uma vez que o impacto ainda não foi mensurado, devido à novidade de cenários de sobreposição de doenças.

5 CONCLUSÕES

- As estratégias presentemente abordadas para a pesquisa de alternativas terapêuticas para doença de Chagas – a triagem fenotípica de novos compostos, o reposicionamento e a combinação de fármacos – foram validadas, e demonstramos a reprodutibilidade dos protocolos *in vitro* e *in vivo*.
- Metronidazol não foi ativo sobre infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* em esquema de monoterapia, mas sua aplicabilidade foi demonstrada em associação ao benznidazol, prolongando a sobrevivência dos animais com proteção parcial contra danos à eletrofisiologia cardíaca recorrente na infecção por este parasito.
- Imatinib apresentou atividade moderada contra *T. cruzi in vitro*, e a combinação com benznidazol exibiu interação de natureza aditiva.
- Os derivados de imatinib apresentaram baixos níveis ou mesmo ausência de toxicidade *in vitro* para células de mamíferos até 50 µM. Os compostos **1a**, **2a-e**, **3a** e **3c-e** apresentaram efeitos tripanossomicidas abaixo de 10 µM, mas sua seletividade não atingiu valores satisfatórios para dar sequência aos estudos *in vivo* (IS ≤ 20).
- Levamisol em monoterapia não exibiu atividade antiparasitária contra infecção por *T. cruzi in vivo*, entretanto a combinação com benznidazol reduziu a carga parasitária e elevou níveis de sobrevivência dos animais possivelmente por seu papel imunomodulador.
- Inibidores de biossíntese de lipídios apresentaram diferentes atividades antiparasitárias sobre distintas cepas e formas proliferativas do *T. cruzi*, evidenciando que o estudo sobre as formas presentes nos hospedeiros invertebrados (epimastigotas) não substituem os testes sobre as amastigotas, por sua vez relevantes para a infecção no hospedeiro vertebrado.
- O sinergismo entre a tomatidina e posaconazol *in vitro* correlacionou-se com os resultados *in vivo*, demonstrando a capacidade da combinação em reduzir a parasitemia e prolongar a sobrevivência dos animais infectados por *T. cruzi* em relação às monoterapias.
- O modelo de coinfeção *T. cruzi* + *S. mansoni* quando testado no modelo de infecção helmíntica tardia impactou sobre a parasitemia, fisiologia cardíaca, histopatologia e

parcialmente sobre perfil de linfócitos TCD4 e TCD8 dos animais experimentalmente infectados.

- O tratamento com Bz manteve sua eficácia tripanossomicida independente da presença ou não da coinfeção por *S. mansoni*, mas revelou pequenas alterações no perfil de células efectoras de memória.
- O modelo ressaltou a importância da avaliação de pacientes quanto à presença de comorbidades e a atenção requerida no planejamento do tratamento nesses casos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABATH, F.G.C.; COUTINHO, E.M.; MONTENEGRO, S.M.L.; *et al.* The use of non-specific immunopotentiators in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 73–76, 1988.

AGOSIN, M. The aerobic metabolism of metronidazole by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 75, n. 2, p. 311–315, 1983.

ALBAJAR-VIÑAS, P.; DIAS, J.C.P. Advancing the Treatment for Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1942–1943, 2014.

ALIROL, E.; SCHRUMPF, D.; AMICI HERADI, J.; *et al.* Nifurtimox-Eflornithine Combination Therapy for Second-Stage Gambiense Human African Trypanosomiasis: Médecins Sans Frontières Experience in the Democratic Republic of the Congo. **Clinical Infectious Diseases**, v. 56, n. 2, p. 195–203, 2013.

AMERY, W.K.; BRUYNSEELS, J.P. Levamisole, the story and the lessons. **International Journal of Immunopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 481–486, 1992.

ARAÚJO, A.; JANSEN, A.M.; REINHARD, K.; *et al.* Paleoparasitology of Chagas disease: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 9–16, 2009.

ARGÜELLES, A.J.; CORDELL, G.A.; MARUENDA, H. Molecular Docking and Binding Mode Analysis of Plant Alkaloids as *in vitro* and *in silico* Inhibitors of Trypanothione Reductase from *Trypanosoma cruzi*. **Natural Product Communications**, v. 11, n. 1, p. 57–62, 2016.

ASHBURN, T.T.; THOR, K.B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 8, p. 673–683, 2004.

AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; *et al.* A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 2004.

AZEVEDO, L.D.; BASTOS, M.M.; VASCONCELOS, F.C.; *et al.* Imatinib derivatives as inhibitors of K562 cells in chronic myeloid leukemia. **Medicinal Chemistry Research**, v. 26, n. 11, p. 2929–2941, 2017.

BAHIA, M.T.; ANDRADE, I.M.; MARTINS, T.A.F.; *et al.* Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1870, 2012.

BAKER, J.R.; SELDEN, L.F. *Trypanosoma (Schizotrypanum) dionisii* as a model for chemotherapeutic studies related to Chagas's disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 1, p. 80–85, 1981.

BARBOSA, M.A. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 20, n. 3, p. 121-132, 1978.

BASCH, P.F. Why do schistosomes have separate sexes? **Parasitology Today**, v. 6, n. 5, p. 160–163, 1990.

BATISTA, D.d.G.J.; BATISTA, M.M.; OLIVEIRA, G.M.d.; *et al.* Arylimidamide DB766, a Potential Chemotherapeutic Candidate for Chagas' Disease Treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 2940–2952, 2010.

BECKMANN, S.; LONG, T.; SCHELD, C.; *et al.* Serum albumin and α -1 acid glycoprotein impede the killing of *Schistosoma mansoni* by the tyrosine kinase inhibitor Imatinib. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 3, p. 287–295, 2014.

BEHERA, R.; THOMAS, S.M.; MENSA-WILMOT, K. New Chemical Scaffolds for Human African Trypanosomiasis Lead Discovery from a Screen of Tyrosine Kinase

Inhibitor Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2202–2210, 2014.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; *et al.* Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2016.

BERN, C.; KJOS, S.; YABSLEY, M.J.; *et al.* *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 655–681, 2011.

BERRIDGE, B.R.; MOWAT, V.; NAGAI, H.; *et al.* Non-proliferative and Proliferative Lesions of the Cardiovascular System of the Rat and Mouse. **Journal of Toxicologic Pathology**, v. 29, n. 3_Suppl, p. 1S-47S, 2016.

BLANDÓN, R.; JOHNSON, C.M.; SOUSA, O.; *et al.* [The clinical experience in Panama with metronidazole in treating Chagas' disease in the acute and chronic phases]. **Revista Medica De Panama**, v. 18, n. 2, p. 94–100, 1993.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 4, p. 389–96, 1962. (6).

BRENER, Z.; CHIARI, E. [Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*]. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 5, p. 220–224, 1963.

BRUNNER, C.J.; MUSCOPLAT, C.C. Immunomodulatory effects of levamisole. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 176, n. 10 Spec No, p. 1159–1162, 1980.

BUCKNER, F.S.; VERLINDE, C.L.; LA FLAMME, A.C.; *et al.* Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.

BURO, C.; BECKMANN, S.; OLIVEIRA, K.C.; *et al.* Imatinib Treatment Causes Substantial Transcriptional Changes in Adult *Schistosoma mansoni* *In Vitro* Exhibiting Pleiotropic Effects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 6, p. e2923, 2014.

BUTLER, P.G. Levamisole and immune response phenomena in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 6, n. 6, p. 1070–1077, 1982.

CAL, M.; IOSET, J.R.; FÜGLI, M.A.; *et al.* Assessing anti- *T. cruzi* candidates *in vitro* for sterile cidal activity. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 6, n. 3, p. 165–170, 2016.

CAMPO, V.L.; MARTINS-TEIXEIRA, M.B.; CARVALHO, I. *Trypanosoma cruzi* Invasion into Host Cells: A Complex Molecular Targets Interplay. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 13, n. Bentham Science Publishers, p. 1084–1097, 2016.

CAMPOS, J.D.S.; HOPPE, L.Y.; DUQUE, T.L.A.; *et al.* Use of Noninvasive Parameters to Evaluate Swiss Webster Mice During *Trypanosoma cruzi* Experimental Acute Infection. **Journal of Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 280–285, 2016.

CARDILLO, F.; PINHO, R.T.; ANTAS, P.R.Z.; *et al.* Immunity and immune modulation in *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathogens and Disease**, p. ftv082, 2015.

CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L.. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro, RJ: Editora Fiocruz, 2008.

CASTRO, J.A.; DIAZ DE TORANZO, E.G. Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Biomedical and environmental sciences: BES**, v. 1, n. 1, p. 19–33, 1988.

CHA, Y.; EREZ, T.; REYNOLDS, I.J.; *et al.* Drug repurposing from the perspective of pharmaceutical companies: Drug repurposing in pharmaceutical companies. **British Journal of Pharmacology**, v. 175, n. 2, p. 168–180, 2018.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, 1909.

CHATAING, B.; CONCEPCIÓN, J.; LOBATÓN, R.; *et al.* Inhibition of *Trypanosoma cruzi* Growth *in vitro* by *Solanum* Alkaloids: A Comparison with Ketoconazole. **Planta Medica**, v. 64, n. 01, p. 31–36, 1998.

CHATELAIN, E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 15, p. 98–103, 2017.

CHATELAIN, E; IOSET, J.R. Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 13, n. 2, p. 141–153, 2018.

CHIU, F.L.; LIN, J.K. Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF- κ B and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages. **FEBS Letters**, v. 582, n. 16, p. 2407–2412, 2008.

CLEGG, J.A. *In vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 16, n. 2, p. 133–147, 1965.

CONCEIÇÃO, M.J.; LENZI, H.L.; COURA, J.R. Human study and experimental behavior of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with different clinical forms of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 108, n. 2–3, p. 98–103, 2008.

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

COURA, J.R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, 2013.

COURA, J.R.; JUNQUEIRA, A.C.V. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. **Acta Tropica**, v. 151, p. 51–57, 2015.

COURA, J.R.; VIÑAS, P.A.; JUNQUEIRA, A.C.V. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for non-endemic countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 7, p. 856–862, 2014.

CRISPE, I.N.; GIANNANDREA, M.; KLEIN, I.; *et al.* Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. **Immunological Reviews**, v. 213, n. 1, p. 101–118, 2006.

CRUZ-RICO, J.; GARRIDO-ACOSTA, O.; ANGUIANO-ROBLEDO, L.; *et al.* Imatinib: farmacocinética. **Revista del Hospital Juárez de México**, v. 80 (1), p. 67–72, 2013.

CUNHA, A.S. **Esquistossomose Mansônica**. São Paulo: Sarvier/EDUSP, 1970.

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

DA SILVA, V.B.R.; CAMPOS, B.R.K.L.; DE OLIVEIRA, J.F.; *et al.* Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3259–3277, 2017.

DAYAN, A.D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**, v. 86, n. 2–3, p. 141–159, 2003.

DE CASTRO, S.L.; BATISTA, D.G.J.; BATISTA, M.M.; *et al.* Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Molecular Biology International**, v. 2011, p. 1–13, 2011.

DE SOUZA, E.M.; NEFERTITI, A.S.G.; BAILLY, C.; *et al.* Differential apoptosis-like cell death in amastigote and trypomastigote forms from *Trypanosoma cruzi*-infected heart cells in vitro. **Cell and Tissue Research**, v. 341, n. 1, p. 173–180, 2010.

DE SOUZA, E.M.; OLIVEIRA, G.M.; SOEIRO, M.N.C. Electrocardiographic Findings in Acutely and Chronically *T. cruzi*-infected Mice Treated by a Phenyl-Substituted Analogue of Furamidine DB569. **Drug Target Insights**, v. 2, p. [117739280700200](https://doi.org/10.1080/17445019.2007.1455100), 2007.

DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi* & Host Cell Interaction. **Frontiers in Immunology**, v. 5, 2014. Disponível em: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2014.00339/abstract>. Acesso em: 17 nov. 2018.

DEVINE, W.; THOMAS, S.M.; ERATH, J.; *et al.* Antiparasitic Lead Discovery: Toward Optimization of a Chemotype with Activity Against Multiple Protozoan Parasites. **ACS Medicinal Chemistry Letters**, v. 8, n. 3, p. 350–354, 2017.

DIAS, C.B. Quimioterapia antimonial na esquistossomose mansônica. Doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Faculdade de Medicina, 1949.

DIAS, J.C.P.; RAMOS JR., A.N.; GONTIJO, E.D.; *et al.* 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. suppl 1, p. 3–60, 2016.

DINIZ, L.F.; URBINA, J.A.; DE ANDRADE, I.M.; *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Experimental Chagas Disease: Positive Interaction in Concomitant and Sequential Treatments. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 8, p. e2367, 2013.

DON, R.; IOSET, J.R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. **Parasitology**, v. 141, n. 01, p. 140–146, 2014.

Drugs for Neglected Diseases Initiative [homepage on the Internet]. DNDi Portfolio. Disponível em <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/> Acessado em 14 de novembro de 2018.

DUFFY, T.; CURA, C.I.; RAMIREZ, J.C.; *et al.* Analytical Performance of a Multiplex Real-Time PCR Assay Using TaqMan Probes for Quantification of *Trypanosoma cruzi* Satellite DNA in Blood Samples. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 1, p. e2000, 2013.

DUTRA, W.O.; MENEZES, C.A.S.; MAGALHÃES, L.M.D.; *et al.* Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 8, p. 377–387, 2014.

EINARSSON, E.; MA'AYEH, S.; SVÄRD, S.G. An up-date on *Giardia* and giardiasis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 47–52, 2016.

ELLIOTT, A.; YAZDANBAKHSH, M. Troubles never come alone: **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 7, n. 3, p. 211–213, 2012.

ENRIQUEZ, G.F.; GARBOSSA, G.; MACCHIAVERNA, N.P.; *et al.* Is the infectiousness of dogs naturally infected with *Trypanosoma cruzi* associated with poly-parasitism? **Veterinary Parasitology**, v. 223, p. 186–194, 2016.

FERRAZ, M.L.; GAZZINELLI, R.T.; ALVES, R.O.; *et al.* The Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas' Disease Is Less Dependent on Gamma Interferon than That of Benznidazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1359–1364, 2007.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

FIVELMAN, Q.L.; ADAGU, I.S.; WARHURST, D.C. Modified Fixed-Ratio Isobologram Method for Studying *In Vitro* Interactions between Atovaquone and Proguanil or

Dihydroartemisinin against Drug-Resistant Strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4097–4102, 2004.

FLÁVIA NARDY, A.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; MORROT, A.. Immune Evasion Strategies of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 1–7, 2015.

FRIEDMAN, M. Anticarcinogenic, Cardioprotective, and Other Health Benefits of Tomato Compounds Lycopene, α -Tomatine, and Tomatidine in Pure Form and in Fresh and Processed Tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 40, p. 9534–9550, 2013.

FRIEDMAN, M. Chemistry and Anticarcinogenic Mechanisms of Glycoalkaloids Produced by Eggplants, Potatoes, and Tomatoes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 13, p. 3323–3337, 2015.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P.R.; MACKEY, B.E. Effect of feeding solanidine, solasodine and tomatidine to non-pregnant and pregnant mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 41, n. 1, p. 61–71, 2003.

FÜGI, M.A.; KAISER, M.; TANNER, M.; *et al.* Match-making for posaconazole through systems thinking. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 2, p. 46–51, 2015.

FUJIWARA, Y.; KIYOTA, N.; TSURUSHIMA, K.; *et al.* Tomatidine, a Tomato Sapogenol, Ameliorates Hyperlipidemia and Atherosclerosis in ApoE-Deficient Mice by Inhibiting Acyl-CoA:cholesterol Acyl-transferase (ACAT). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2472–2479, 2012.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.

GONÇALVES, C.S.; ÁVILA, A.R.; DE SOUZA, W.; *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, 2018. Disponível em:

<<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-018-2664-4>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

GREER, N.D. Posaconazole (Noxafil): A New Triazole Antifungal Agent. **Baylor University Medical Center Proceedings**, v. 20, n. 2, p. 188–196, 2007.

GUEDES-DA-SILVA, F.H.; BATISTA, D.G.J.; DA SILVA, C.F.; *et al.* Antitrypanosomal Activity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Inhibitors VNI and VFV in the Swiss Mouse Models of Chagas Disease Induced by the *Trypanosoma cruzi* Y Strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02098-16>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

GUEDES-DA-SILVA, F.H.; BATISTA, D.G.J.; MEUSER, M.B.; *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Trypanosomicidal Action of Novel Arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2425–2434, 2016.

HABERL, B.; KALBE, M.; FUCHS, H.; *et al.* *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium*: Miracidial host-finding behaviour is stimulated by macromolecules. **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 5, p. 551–560, 1995.

HE, Y.X.; CHEN, L.; RAMASWAMY, K. *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, and *S. japonicum*: early events associated with penetration and migration of schistosomula through human skin. **Experimental Parasitology**, v. 102, n. 2, p. 99–108, 2002.

NÚÑEZ, H.L.; SELVA, E.F. Forma aguda de la enfermedad de Chagas, importância semiológica del Signo de Romana – Informe de los dos primeiros casos em Honduras. **REV. MED. HONDUR.**, v. 39, p. 5–15, 1971.

HOMET MORENO, B.; GARRALDA CABANAS, E.; HITT, R.. Tyrosine kinase inhibitors in treating soft tissue sarcomas: sunitinib in non-GIST sarcomas. **Clinical and Translational Oncology**, v. 12, n. 7, p. 468–472, 2010.

HOTEZ, P.J. Human Parasitology and Parasitic Diseases: Heading Towards 2050. *In: Advances in Parasitology*. [s.l.]: Elsevier, 2018, v. 100, p. 29–38. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065308X1830006X>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

HOTEZ, P.J.; PECOUL, B.; RIJAL, S.; *et al.* Eliminating the Neglected Tropical Diseases: Translational Science and New Technologies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0003895, 2016.

HOYOS, C.L.; CAJAL, S.P.; JUAREZ, M.; *et al.* Epidemiology of American Tegumentary Leishmaniasis and *Trypanosoma cruzi* Infection in the Northwestern Argentina. **BioMed Research International**, v. 2016, p. 1–8, 2016.

ILARI, A.; GENOVESE, I.; FIORILLO, F.; *et al.* Toward a Drug Against All Kinetoplastids: From LeishBox to Specific and Potent Trypanothione Reductase Inhibitors. **Molecular Pharmaceutics**, v. 15, n. 8, p. 3069–3078, 2018.

JORGE, T.A.C.; CASTRO, S.L. (Org.). **Doença de chagas: manual para experimentação animal; edição comemorativa aos 90 anos da descoberta da doença de chagas (1909-1999)**. Rio de Janeiro: Ed. Fiocruz, 2000.

KAISER, M.; MÄSER, P.; TADOORI, L.P.; *et al.* Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. **PLOS ONE**, v. 10, n. 8, p. e0135556, 2015.

KAPLAN, M.H.; WHITFIELD, J.R.; BOROS, D.L.; *et al.* Th2 cells are required for the *Schistosoma mansoni* egg-induced granulomatous response. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 160, n. 4, p. 1850–1856, 1998.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, v. 14, n. 6, p. 397–400, 1972.

KESSELHEIM, A.S.; MYERS, J.A.; SOLOMON, D.H.; *et al.* The Prevalence and Cost of Unapproved Uses of Top-Selling Orphan Drugs. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, p. e31894, 2012.

KESSLER, R.L.; CONTRERAS, V.T.; MARLIÉRE, N.P.; *et al.* Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host: *Trypanosoma cruzi* rdEpi are infective to mammal. **Molecular Microbiology**, v. 104, n. 5, p. 712–736, 2017.

KLOETZEL, K.; FALEIROS, J.J.; MENDES, S.R.; *et al.* Concomitant infection of albino mice by *Trypanosoma cruzi* and *Schistosoma mansoni* parasitological parameters. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 5, p. 652–658, 1973.

KÖKSAL, Z.Ş.; YANIK, K.; BILGIN, K.; *et al.* *In Vivo* Efficacy of Drugs against *Toxoplasma gondii* Combined with Immunomodulators. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 69, n. 2, p. 113–117, 2016.

LANNES-VIEIRA, J.; DE ARAÚJO-JORGE, T.C.; SOEIRO, M.N.C.; *et al.* The Centennial of the Discovery of Chagas Disease: Facing the Current Challenges. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, p. e645, 2010.

LENZI, H.L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involution: morphogenetic and biomechanical approaches. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. suppl 1, p. 141–151, 1998.

LENZI, J.A. Estudo do modelo de *Calomys callosus* RENGGER, 1980 (Rodentia: Cricetidae) na infecção por *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907; Parâmetros parasitológicos e histopatológico, 1998. Tese de doutorado. Salvador: Cursos de Pós-Graduação em Patologia, Universidade Federal da Bahia.

LEVI, G.C.; AMATO NETO, V. Tratamento pelo metronidazol de pacientes com a forma crônica da Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 4, n. 3, p. 173–175, 1970.

LIONEL, N.D.W.; MIRANDO, E.H.; NANAYAKKARA, J.C.; *et al.* Levamisole in the treatment of ascariasis in children. **BMJ**, v. 4, n. 5679, p. 340–341, 1969.

LUSTIGMAN, S.; PRICHARD, R.K.; GAZZINELLI, A.; *et al.* A Research Agenda for Helminth Diseases of Humans: The Problem of Helminthiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, p. e1582, 2012.

MANLEY, P.W.; COWAN-JACOB, S.W.; BUCHDUNGER, E.; *et al.* Imatinib: a selective tyrosine kinase inhibitor. **European Journal of Cancer**, v. 38, p. S19–S27, 2002.

MAUDE, R.J.; SILAMUT, K.; PLEWES, K.; *et al.* Randomized Controlled Trial of Levamisole Hydrochloride as Adjunctive Therapy in Severe Falciparum Malaria With High Parasitemia. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 1, p. 120–129, 2014.

MCMANUS, D.P.; DUNNE, D.W.; SACKO, M.; *et al.* Schistosomiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41572-018-0013-8>>. Acesso em: 17 nov. 2018.

MEDINA, J.M.; RODRIGUES, J.C.F.; DE SOUZA, W.; *et al.* Tomatidine promotes the inhibition of 24-alkylated sterol biosynthesis and mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1253–1265, 2012.

MEDINA, J.M.; RODRIGUES, J.C.F.; MOREIRA, O.C.; *et al.* Mechanisms of growth inhibition of *Phytomonas serpens* by the alkaloids tomatine and tomatidine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 48–55, 2015.

MEIRELLES, M.N.; DE ARAUJO-JORGE, T.C.; MIRANDA, C.F.; *et al.* Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. **European Journal of Cell Biology**, v. 41, n. 2, p. 198–206, 1986.

MELO, T.G.; TUCCI, A.R.; NOGUEIRA, A.R.; *et al.* The involvement of FAK and Src in the invasion of cardiomyocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 139, p. 49–57, 2014.

MENEZES, C.B.; FRASSON, A.P.; TASCA, T. Trichomoniasis – are we giving the deserved attention to the most common non-viral sexually transmitted disease worldwide? **Microbial Cell**, v. 3, n. 9, p. 404–418, 2016.

MENNA-BARRETO, R.; DE CASTRO, S. Clear Shot at Primary Aim: Susceptibility of *Trypanosoma cruzi* Organelles, Structures and Molecular Targets to Drug Treatment. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 10, p. 1212–1234, 2017.

METWALI, A.; ELLIOTT, D.; BLUM, A.M.; *et al.* The granulomatous response in murine *Schistosomiasis mansoni* does not switch to Th1 in IL-4-deficient C57BL/6 mice. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 157, n. 10, p. 4546–4553, 1996.

Ministério da Saúde, Brasília, Brasil. 2017 [homepage on the Internet]. Disponível em <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose/situacao-epidemiologica> Acessado em 27 de outubro de 2018.

MITCHELL, G.I.; GATTUSO, M.; GRONDIN, G.; *et al.* Tomatidine Inhibits Replication of *Staphylococcus aureus* Small-Colony Variants in Cystic Fibrosis Airway Epithelial Cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p. 1937–1945, 2011.

MITCHELL, G.; LAFRANCE, M.; BOULANGER, S.; *et al.* Tomatidine acts in synergy with aminoglycoside antibiotics against multiresistant *Staphylococcus aureus* and prevents virulence gene expression. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 3, p. 559–568, 2012.

MOLINA, I.; GÓMEZ I PRAT, J.; SALVADOR, F.; *et al.* Randomized Trial of Posaconazole and Benznidazole for Chronic Chagas' Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–1908, 2014.

MOLYNEUX, D.H.; HOTEZ, P.J.; FENWICK, A. “Rapid-Impact Interventions”: How a Policy of Integrated Control for Africa’s Neglected Tropical Diseases Could Benefit the Poor. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 11, p. e336, 2005.

MORATO, M.J.F.; COLLEY, D.G.; POWELL, M.R. Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 123–125, 1998.

MOREIRA DA SILVA, R.; OLIVEIRA, L.T.; SILVA BARCELLOS, N.M.; *et al.* Preclinical Monitoring of Drug Association in Experimental Chemotherapy of Chagas' Disease by a New HPLC-UV Method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3344–3348, 2012.

MOREIRA, O.C.; RAMÍREZ, J.D.; VELÁZQUEZ, E.; *et al.* Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: A substudy from the BENEFIT trial. **Acta Tropica**, v. 125, n. 1, p. 23–31, 2013.

MORILLO, C.A.; WASKIN, H.; SOSA-ESTANI, S.; *et al.* Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. cruzi* Carriers. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 69, n. 8, p. 939–947, 2017.

MUSUMECI, F.; SCHENONE, S.; GROSSI, G.; *et al.* Analogs, formulations and derivatives of imatinib: a patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 25, n. 12, p. 1411–1421, 2015.

MUTCH, R.S.; HUTSON, P.R. Levamisole in the adjuvant treatment of colon cancer. **Clinical Pharmacy**, v. 10, n. 2, p. 95–109, 1991.

NEVES, J. Estudo clínico da fase pré-postural da esquistossomose mansônica. **Revista da Associação Médica de Minas Gerais**, v. 16, p. 1–4, 1965.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years [±]. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NWAKA, S.; HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, n. 11, p. 941–955, 2006.

NZILA, A.; MA, Z.; CHIBALE, K. Drug repositioning in the treatment of malaria and TB. **Future Medicinal Chemistry**, v. 3, n. 11, p. 1413–1426, 2011.

O'CONNELL, E.M.; BENNURU, S.; STEEL, C.; *et al.* Targeting Filarial Abl-like Kinases: Orally Available, Food and Drug Administration–Approved Tyrosine Kinase Inhibitors Are Microfilaricidal and Macrophilicidal. **Journal of Infectious Diseases**, v. 212, n. 5, p. 684–693, 2015.

OPREA, T.I.; MESTRES, J. Drug Repurposing: Far Beyond New Targets for Old Drugs. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 4, p. 759–763, 2012.

ORHAN, I.; ŞENER, B.; KAISER, M.; *et al.* Inhibitory Activity of Marine Sponge-Derived Natural Products against Parasitic Protozoa. **Marine Drugs**, v. 8, n. 1, p. 47–58, 2010.

OSAKUNOR, D.N.M.; SENGEH, D.M.; MUTAPI, F. Coinfections and comorbidities in African health systems: At the interface of infectious and noninfectious diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 9, p. e0006711, 2018.

PAPADOPOULOU, M.V.; BLOOMER, W.D.; ROSENZWEIG, H.S.; *et al.* Discovery of potent nitrotriazole-based antitrypanosomal agents: *In vitro* and *in vivo* evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 19, p. 6467–6476, 2015.

PATHAK, V.; COLAH, R.; GHOSH, K. Tyrosine kinase inhibitors: New class of antimalarials on the horizon? **Blood Cells, Molecules, and Diseases**, v. 55, n. 2, p. 119–126, 2015.

PATTERSON, J.S.; GUHL, F. Geographical Distribution of Chagas Disease. *In: American Trypanosomiasis*. [s.l.]: Elsevier, 2010, p. 83–114. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123848765000058>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

PAULIN, J.J.; WHITE, R.; AGOSIN, M. Ultrastructural modifications during the metabolism of metronidazole by *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Submicroscopic Cytology**, v. 15, n. 4, p. 951–964, 1983.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 499, 2002.

PEREZ, C.J.; LYMBERY, A.J.; THOMPSON, R.C. Andrew. Chagas disease: the challenge of polyparasitism? **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 176–182, 2014.

PRATA, A. Biópsia retal na esquistossomose mansônica: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento. Tese de livre-docência, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Rio de Janeiro, 1957.

PRATA, A. Schistosomiasis mansoni. **Clinics in Gastroenterology**, v. 7, p. 49–75, 1978.

PRATA, A. A fase inicial da esquistossomose mansônica em área hiperendêmica. *In*: Rio de Janeiro: [s.n.], 1995.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

PUBCHEM [homepage on the Internet]. Estruturas químicas das moléculas disponíveis em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> Acessado em 22 de outubro de 2018.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RASSI JR, A.; MARIN NETO, J.A.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017.

RÄZ, B.; ITEN, M.; GREYER-BÜHLER, Y.; *et al.* The Alamar Blue® assay to determine drug sensitivity of African trypanosomes (*T.b. rhodesiense* and *T.b. gambiense*) in vitro. **Acta Tropica**, v. 68, n. 2, p. 139–147, 1997.

REIS, M.G.; ANDRADE, Z.A. Functional significance of periovular granuloma in schistosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research = Revista Brasileira De Pesquisas Medicas E Biologicas**, v. 20, n. 1, p. 55–62, 1987.

REY, L. Parasitologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

REZAI, H.R.; BEHBEHANI, A.B.; GETTNER, S.; *et al.* Effect of levamisole on the course of experimental leishmaniasis in guinea-pigs and mice: haematological and immunological findings. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 82, n. 3, p. 243–249, 1988.

RICHTER, J.; HATZ, C.; CAMPAGNE, G; BERGQUIST, N. R; JENKINS, J.M. *et al.* (2000). Ultrasound in schistosomiasis: a practical guide to the standard use of ultrasonography for assessment of schistosomiasis-related morbidity: Second international workshop, October 22-26 1996, Niamey, Niger / editors: J. Richter ... [et al.], Revised and updated. Geneva: World Health Organization. <http://www.who.int/iris/handle/10665/66535> Acessado em 27 de outubro 2018.

RIFAAT, L.K.; MOHAMMAD, M.A.; JAWDAT, S.Z. Ivermectin, levamisole and thymic extract for chemotherapy and immunostimulation of visceral leishmaniasis in hamsters and mice. **Japanese Journal of Medical Science and Biology**, v. 42, n. 2, p. 51–61, 1989.

RISVANLI, A; AYDIN, M. The effects of levamisole on the pregnancy rate, average litter size, sexuality, living rate and lactation period in rats. **Firat University Journal of Health Sciences**, v. 17, p. 45–47, 2003.

RIX, U.; HANTSCHHEL, O.; DURNBURGER, G.; *et al.* Chemical proteomic profiles of the BCR-ABL inhibitors imatinib, nilotinib, and dasatinib reveal novel kinase and nonkinase targets. **Blood**, v. 110, n. 12, p. 4055–4063, 2007.

RODRIGUES, J.P.F.; CALDAS, I.S.; GONÇALVES, R.V.; *et al.* *S. mansoni* - *T. cruzi* co-infection modulates arginase-1/iNOS expression, liver and heart disease in mice. **Nitric Oxide**, v. 66, p. 43–52, 2017.

RODRIGUEZ-MORALES, A.J.; BENITEZ, J.A.; TELLEZ, I.; *et al.* Chagas disease screening among Latin American immigrants in non-endemic settings. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 3, p. 162–163, 2008.

ROE, F.J. Metronidazole: review of uses and toxicity. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 3, n. 3, p. 205–212, 1977.

ROMANHA, A.J.; CASTRO, S.L.; SOEIRO, M.N.C.; *et al.* *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 233–238, 2010.

ROUQUAYROL, M. Z.; ALMEIDA-FILHO, N. **Epidemiologia e Saúde**. 6. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2003.

SANTOS, C.C.; LIONEL, J.R.; PERES, R.B.; *et al.* *In Vitro*, *In Silico*, and *In Vivo* Analyses of Novel Aromatic Amidines against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 62, n. 2, 2018.

SCARIM, C.B.; JORNADA, D.H.; CHELUCCI, R.C.; *et al.* Current advances in drug discovery for Chagas disease. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 155, p. 824–838, 2018.

SCHERB, J. [Therapeutic efficiency of Levamisole in human ascariasis]. **Hospital (Rio De Janeiro, Brazil)**, v. 76, n. 3, p. 1067–1070, 1969.

SCHMID, C.; KUEMMERLE, A.; BLUM, J.; *et al.* In-Hospital Safety in Field Conditions of Nifurtimox Eflornithine Combination Therapy (NECT) for *T. b. gambiense* Sleeping Sickness. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 11, p. e1920, 2012.

SCHOLTE, R.G.C.; GOSONI, L.; MALONE, J.B.; *et al.* Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**, v. 132, p. 57–63, 2014.

SIMÕES-SILVA, M.R.; NEFERTITI, A.S.G.; DE ARAÚJO, J.S.; *et al.* Phenotypic Screening *In Vitro* of Novel Aromatic Amidines against *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 8, p. 4701–4707, 2016.

SIMÕES-SILVA, M.R.; DE ARAÚJO, J.S.; OLIVEIRA, G.M.; *et al.* Drug repurposing strategy against *Trypanosoma cruzi* infection: *In vitro* and *in vivo* assessment of the activity of metronidazole in mono- and combined therapy. **Biochemical Pharmacology**, v. 145, p. 46–53, 2017.

SOEIRO, M.N.C.; DE SOUZA, E.M.; DA SILVA, C.F.; *et al.* *In Vitro* and *In Vivo* Studies of the Antiparasitic Activity of Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) Inhibitor VNI against Drug-Resistant Strains of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 9, p. 4151–4163, 2013.

SOLTANI, R.; FAZELI, H.; BAHRI NAJAFI, R.; *et al.* Evaluation of the Synergistic Effect of Tomatidine with Several Antibiotics against Standard and Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 16, n. 1, p. 290–296, 2017.

STAUFFERT, D.; SILVEIRA, M.F.; MESENBURG, M.A.; *et al.* Prevalence of *Trypanosoma cruzi* /HIV coinfection in southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 180–184, 2017.

SUN, W.; SANDERSON, P.E.; ZHENG, W. Drug combination therapy increases successful drug repositioning. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 7, p. 1189–1195, 2016.

TCHUEM TCHUENTÉ, L-A.; SOUTHGATE, V.R.; COMBES, C.; *et al.* Mating behaviour in Schistosomes: Are paired worms always faithful? **Parasitology Today**, v. 12, n. 6, p. 231–236, 1996.

TIMM, B.L.; DA SILVA, P.B.; BATISTA, M.M.; *et al.* *In vitro* investigation of the efficacy of novel diamidines against *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 141, n. 10, p. 1272–1276, 2014.

TORRICO, F.; GASCON, J.; ORTIZ, L.; *et al.* Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 419–430, 2018.

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

URBINA, J.A. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 311–318, 2009.

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

URBINA, J.A. Pharmacodynamics and Follow-Up Period in the Treatment of Human *Trypanosoma cruzi* Infections With Posaconazole. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 70, n. 2, p. 299–300, 2017.

VALE, N.; GOUVEIA, M.J.; RINALDI, G.I.; *et al.* Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.02582-16>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

VILLAMIL-GÓMEZ, W.E.; SILVERA, L.A.; HENAO-PALENCIA, S.; *et al.* Coinfection of *Trypanosoma cruzi* and *Mycobacterium tuberculosis* in a patient from Colombia. **Journal of Infection and Public Health**, v. 9, n. 1, p. 113–115, 2016.

WETZEL, D.M.; MCMAHON-PRATT, D.; KOLESKE, A.J. The Abl and Arg Kinases Mediate Distinct Modes of Phagocytosis and Are Required for Maximal Leishmania Infection. **Molecular and Cellular Biology**, v. 32, n. 15, p. 3176–3186, 2012.

WHITFIELD, P.J.; BARTLETT, A.; KHAMMO, N.; *et al.* Age-dependent survival and infectivity of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 29–35, 2003.

YOSHINO, T.P.; BOYLE, J.P.; HUMPHRIES, J.E. Receptor–ligand interactions and cellular signalling at the host–parasite interface. **Parasitology**, v. 123, n. 07, 2001. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182001007685>. Acesso em: 19 nov. 2018.

ZINGALES, B; ANDRADE, SG; BRIONES, M.R.S.; *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; *et al.* The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

ZINGALES, B.; MILES, M.A; MORAES, C.B; *et al.* Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 828–833, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva: 2002. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis [homepage on the Internet]. Disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42588/1/WHO_TRS_912.pdf?ua=1 Acessado em 27 outubro 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2012). WHO Roadmap on NTDs [homepage on the Internet]. Disponível em <https://unitingtocombatntds.org/resources/who-roadmap-ntds/> Acessado em 25 de outubro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014). Neglected Tropical Diseases, a statistical update – latest data available [homepage on the Internet]. Disponível em https://www.who.int/gho/neglected_diseases/en/ Acessado em 25 de outubro de 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva: 2015. **Satellite Symposium on Ultrasound Methodology in *Schistosoma mansoni* infection.** (Weekly Epidemiological Records).

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease in Latin America: An epidemiological update based on 2010 estimates. **Weekly Epidemiological Records** v. 90, p. 33–43, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, Geneva; 2016. Global Health Estimates 2015: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2015. Disponível em http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/estimates/en/index1.html
Acessado em 27 outubro 2018.

APÊNDICE A - RESULTADOS SUPLEMENTARES REFERENTES AO ARTIGO 3 (ITEM 3.3)

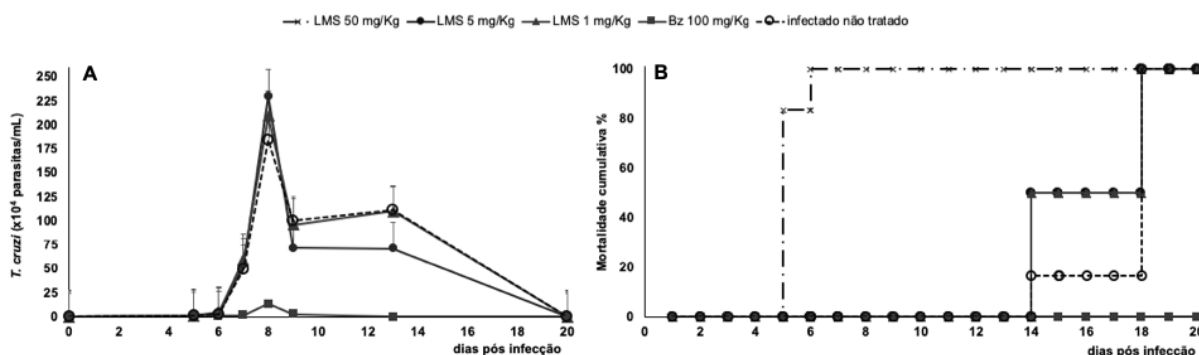


Figura suplementar 1: Parasitemia (A) e mortalidade cumulativa (B) de camundongos machos Swiss Webster infectados com *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) não tratados, tratados pela via oral com benznidazol 100 mg/Kg, e tratados pela via intraperitoneal com levamisol nas doses de 50, 5 e 1 mg/Kg, por cinco dias consecutivos (5^o - 9^o dia pós infecção).

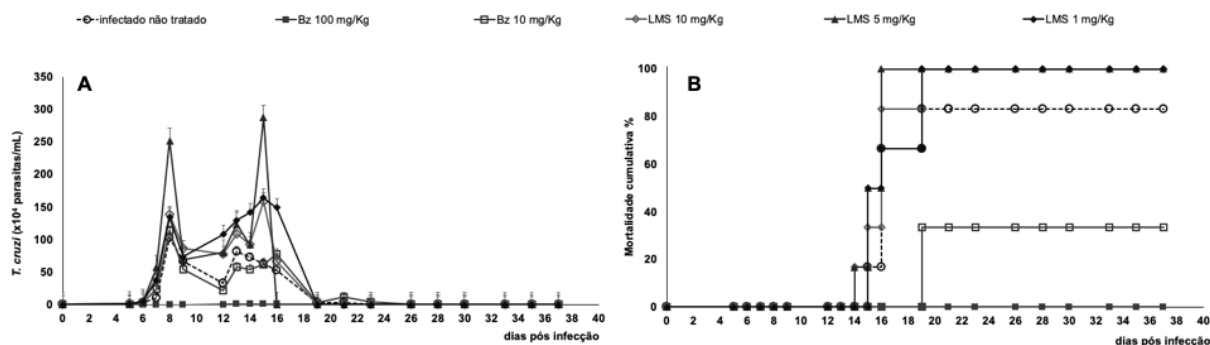


Figura suplementar 2: Parasitemia (A) e mortalidade cumulativa (B) de camundongos machos Swiss Webster infectados com *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) não tratados, tratados pela via oral com benznidazol 100 e 10 mg/Kg, e tratados pela via oral com levamisol nas doses de 10, 5 e 1 mg/Kg, por cinco dias consecutivos (5^o - 9^o dia pós infecção).

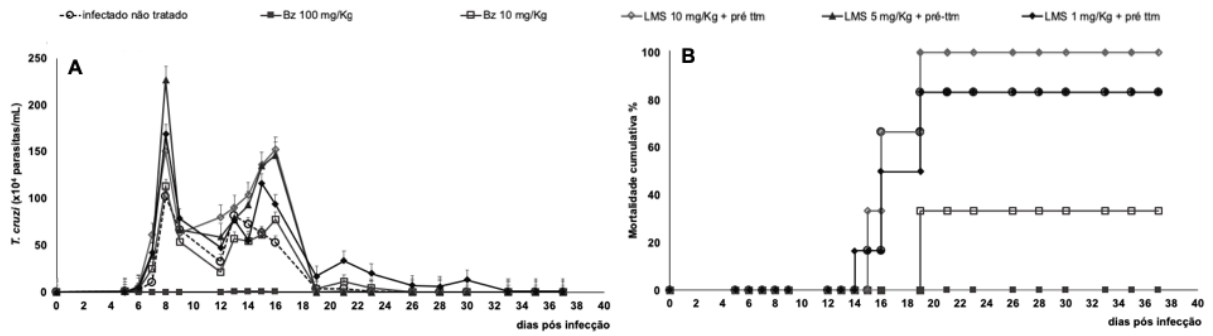


Figura suplementar 3: Parasitemia (A) e mortalidade cumulativa (B) de camundongos machos Swiss Webster infectados com *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) não tratados, tratados pela via oral com benznidazol 100 e 10 mg/Kg, e tratados pela via oral com levamisol nas doses de 10, 5 e 1 mg/Kg, por cinco dias consecutivos (5º - 9º dia pós infecção) e com pré-tratamento (+ pré ttm) em dose única da mesma concentração designada ao grupo.

APÊNDICE B - LICENÇAS CONCEDIDAS PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/IOC)

O presente trabalho foi realizado dentro dos princípios de ética para o uso de animais de experimentação autorizado e regulamentado em L-038/2016 e L-038/2017.



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC

LICENÇA

L-038/2016

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-028/2016), intitulado "O reposicionamento de medicamentos para o tratamento da doença de Chagas associada à comorbidades: impacto de terapias isoladas e combinadas no curso de coinfeção esquistossomótica e pelo *Trypanosoma cruzi*", sob a responsabilidade de **MARIA DE NAZARÉ CORREIA SOEIRO** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/03/2019 e inclui o uso total de:

Camundongo, cepa:

Mus musculus / Swiss webster – 72 animais fêmeas – 21 dias de gestação

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 24 de agosto de 2016.

Flávio Alves Lara

Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz

Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21045-360 Tel: (21) 2562-1056



Instituto Oswaldo Cruz

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/IOC

LICENÇA

L-038/2017

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-030/2017), intitulado "Estudo sobre a utilização de novos quimioterápicos experimentais no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* em camundongos", sob a responsabilidade de **MARIA DE NAZARÉ CORREIA SOEIRO** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 31/01/2022 e inclui o uso total de:

Animal	Espécie ou linhagem	Quant (total)	♂	♀	Idade	Peso	Origem
camundongo	<i>M. musculus</i> Swiss Webster	13.920 (Procedimentos: 1,2,3,5,6,7 e 17)	480 (Procedimento 3) 13.440 (Procedimentos 5,6 e 7)			13-18g	ICTB
	<i>M. musculus</i> Swiss Webster	1.152 (Procedimentos 1,2,4 e 17)		1.152 (Procedimento 4)	Grávidas com 21 dias de gestação		ICTB
	<i>M. musculus</i> Swiss Webster	800 (Procedimentos 1,2,8 e 17)		800 (Procedimento 8)		18-20g	ICTB
	<i>M. musculus</i> Swiss Webster	8.832 (Procedimentos 1,2,5,9,10,11,12,13 e 17)	8.832 (Procedimentos 1,2,5,9,10,11,12,13 e 17)			11-13g	ICTB
	<i>M. musculus</i> BALB/c An	1.392 (Procedimento 1,2,11,12,13,14,15,16 e 17)	Proc 14: 288 (Procedimento 14) 1.104 (Procedimento 11,12,13,15, 16 e 17)		8 semanas de vida		ICTB

Observação: Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 29 de novembro de 2017.

Flávio Alves Lara
Coordenador da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz
Fundação Oswaldo Cruz

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056