

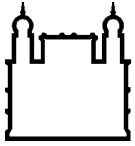
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**INTEGRAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS PARA A AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA, PROPRIEDADES ADMET E ALVOS
CELULARES DE NOVAS ARILIMIDAMIDAS SOBRE *Trypanosoma cruzi***

CAMILA CARDOSO SANTOS

Rio de Janeiro
Dezembro de 2016



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Camila Cardoso Santos

Integração de diferentes abordagens para a avaliação de atividade antiparasitária, propriedades ADMET e alvos celulares de novas Arilimidamidas sobre *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária

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

RIO DE JANEIRO
Dezembro de 2016

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

S237 Santos, Camila Cardoso

Integração de diferentes abordagens para a avaliação de atividade antiparasitária, propriedades admet e alvos celulares de novas arilimidamidas sobre *Trypanosoma cruzi* / Camila Cardoso Santos. – Rio de Janeiro, 2016.

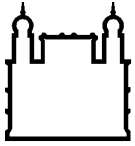
xix, 74 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2016.

Bibliografia: f. 71-89

1. Doença de Chagas. 2. Arilimidamidas. 3. Quimioterapia experimental. 4. *In vivo*. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

AUTOR: CAMILA CARDOSO SANTOS

**INTEGRAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS PARA A AVALIAÇÃO DE
ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA, PROPRIEDADES ADMET E ALVOS
CELULARES DE NOVAS ARILIMIDAMIDAS SOBRE *Trypanosoma cruzi***

ORIENTADORA: Prof. Dr. Maria de Nazaré Correia Soeiro

Aprovada em: 19/12/2016

EXAMINADORES:

Prof. Dra. Mirian Claudia de Souza Pereira – Presidente (IOC/Fiocruz)

Prof. Dra. Maria Terezinha Bahia (NUPEB/UFOP)

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

Prof. Dr. Otacilio da Cruz Moreira (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Israel Felzenszwalb (IBRAG/UERJ)

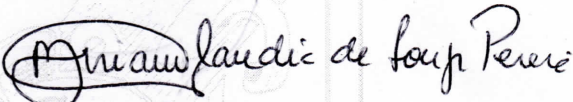
Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2016

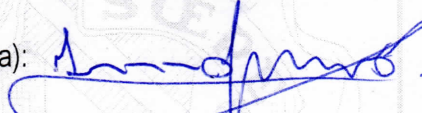


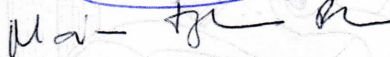
Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Camila Cardoso Santos**, sob orientação da Dr^a. Maria de Nazaré Correia Soeiro. Ao décimo nono dia do mês de dezembro de dois mil e dezesseis, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **"Integração de diferentes abordagens para a avaliação de atividade antiparasitária, propriedades ADMET e alvos celulares de novas arilimidamidas sobre Trypanosoma cruzi"** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração: 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^a. Mirian Claudia de Souza Pereira - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos - IOC/FIOCRUZ, Dr^a. Maria Terezinha Bahia - UFOP/MG e como suplentes: Dr. Otacilio da Cruz Moreira - IOC/FIOCRUZ e Dr. Israel Felzenszwalb - UERJ/RJ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestre em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 19 de dezembro de 2016.

Dr^a. Mirian Claudia de Souza Pereira (Presidente da Banca): 

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

Dr^a. Maria Terezinha Bahia (Membro da Banca): 

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa): 

Dedico a minha dissertação a todos os portadores de Doença de Chagas conscientes ou não de suas condições

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, eu agradeço à minha orientadora Maria de Nazaré Correia Soeiro, pela excelente orientação que me foi dada e conhecimento passado, retrato da sublime e dedicada profissional que serve de exemplo a todos nós;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e demais órgãos de fomento pelo auxílio financeiro;

À Pós-graduação de Biologia Parasitária, que de veras me proporcionou um curso de excelência e oportunidade única de crescimento em minha carreira acadêmica, além de colegas de sala formidáveis;

Aos técnicos do LBC Marcos Meuser, Patrícia Bernardino e Raíza Brandão pelo imensurável apoio fornecido, inigualável trabalho realizado e conhecimento puro da matéria que transpassam com muita alegria aos que almejam e com eles convivem, nos dando a oportunidade de aprender com muito prazer. À Andreia da esterilização que também faz um trabalho base fundamental;

Aos colaboradores que passaram pelo meu caminho Carolina Horta e Bruno Braga da Universidade de Goiânia, que com imensa receptividade e profissionalismo me receberam e compartilharam seus conhecimentos que complementaram meu saber;

À técnica do laboratório de Biologia Estrutural Sandra Maria, que também me permitiu vivenciar a rotina de alguém que faz o que verdadeiramente ama tão bem, me ensinando com muito carinho as maravilhas da microscopia eletrônica assim como a equipe da Plataforma de Microscopia Eletrônica Rudolf Barth;

A todos os alunos do LBC Beatriz, Carlos, Mariane, Aline, Rayzza, Rayane, João, Julianas, Cristiane, Denise, Magna, Thabata dentre outros sem excessão, que sempre se mostraram aptos a me ajudar quando precisei e fazem do LBC o laboratório cooperativo que é. Além dos que vieram para colaborar como Gevânio, nos proporcionando troca de conhecimento e amizade inigualáveis;

Ao Rubem, Solange, Kelly Demarque, Gabriel e Alice pela ajuda e conhecimento trocado. Eu me sinto muito agradecida por poder conviver com profissionais de qualidade como vocês. E a todos os outros profissionais do LBC não listados;

A todas as pessoas que participaram da minha carreira acadêmica e amigos da turma de Biologia da UFMG que esta me proporcionou, em especial Ana Cristina, Bruno Marçal, Alexandre, Mauricio, Sávio, Luige, Luiza, Maísa, Bethânia, Policarpo e todos os orientadores que trilharam meu caminho, em especial Rubens do Monte;

Aos meus amigos da vida Vinícius, Júlia e Thaís que sempre me ajudaram incondicionalmente e que fazem minha vida feliz;

A todos da minha família que me apoiam nos sonhos de todas as formas possíveis desde a infância e que por si só são fontes de inspiração, nunca deixando de acreditar em mim, em especial a minha mãe Luciana, peça fundamental nas minhas conquistas ao longo da vida na qual o impossível não existe;

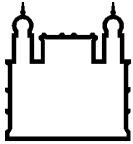
Ao meu marido Baby, companheiro de vida e desta incrível jornada de morar no Rio e poder trabalhar na Fiocruz;

À arte e à dança, que com imensurável fonte de endorfina, serotonina e ocitocina me complementam nesta cativante profissão de pesquisadora que estou a trilhar;

À vida em si, que sempre foi muito boa comigo, fonte de oportunidades, conquistas, lugares e pessoas maravilhosas como meus queridos *bristolians*.

“Vós, os que vos tendes entregado às artes, às letras, às ciências, não esqueçais que de todas elas a mãe é a liberdade, e que sem esta o desenvolvimento daquelas é uma quimera fatal.”

Rui Barbosa



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTEGRAÇÃO DE DIFERENTES ABORDAGENS PARA A AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA, PROPRIEDADES ADMET E ALVOS CELULARES DE NOVAS ARILIMIDAMIDAS SOBRE *Trypanosoma cruzi*

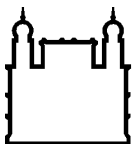
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITARIA

Camila Cardoso Santos

A fim de contribuir para identificação de novas alternativas para o tratamento da silenciosa e progressiva doença de Chagas (DC), na presente dissertação a atividade *in silico*, *in vitro* e *in vivo* de cinco novas arilimidamidas (AIAs) foi realizada. Filtros computacionais de falso-positivos classificaram as AIAs 2EVK008, 27SMB078, 28SMB032, 31DAP069, 36DAP015 como compostos não formadores de PAINS, além de um painel farmacocinético favorável. As triagens com células *in vitro* mostraram que a maioria dos compostos exibiu atividade promissora contra formas tripomastigotas sanguíneas (cepa Y – DTU II) e sobre formas intracelulares (cepa tulahuen – DTU VI), com EC_{50} variando entre 0,3-10,5 μM e 0,5-7,8 μM respectivamente. A terapia combinada de benznidazol (Bz) e 28SMB032, usando uma metodologia de proporções fixas, foi indicativa de ausência de interação. A atividade tripanocida foi posteriormente validada usando culturas de células cardíacas como células hospedeiras e formas intracelulares da cepa Y e verificou-se que 28SMB032 apresentou efeito semelhante ao Bz (cerca de 1.5 μM) além de alta seletividade (IS = 191), encorajando-nos a dar continuidade com este composto nos ensaios *in vivo*. Infelizmente o 28SMB032 foi muito tóxico para os modelos murinos de infecção aguda por *T. cruzi*, provocando > 83% de mortalidade em curto período pós-tratamento, provavelmente devido à insuficiência renal aguda. No estudo em questão, a predição computacional de alvos *in silico* usando *target fishing* e abordagens ultraestruturais foram combinadas para explorar os componentes celulares de formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* tratados por AIAs previamente selecionadas nos estudos *in vitro*. A análise ultraestrutural demonstrou que, embora a análise computacional tenha predito o DNA como alvo principal das AIAs estudadas, não foram observadas alterações significativas no material genético do núcleo e mitocôndria (kDNA) do parasito tratado. Os danos celulares mais frequentes detectados pela microscopia eletrônica de transmissão foram distorção de Golgi, distensão da membrana plasmática e do envelope nuclear além da

presença de grande número de membranas concêntricas e figuras de mielina, de perfis de retículo endoplasmático envolvendo componentes citoplasmáticos sugestivos de morte celular por autofagia. Esta tradução ineficaz entre os resultados *in vitro*, *in silico* e *in vivo* reforça a importância de se explorar diferentes abordagens durante os estudos pré-clínicos, a fim de contribuir para a descoberta de fármacos para o tratamento da DC.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

INTEGRATION OF DIFFERENT APPROACHES FOR EVALUATION OF ACTIVITY, ADMET PROPERTIES AND CELLULAR TARGETS OF NOVEL ARYLIMIDAMIDES UNDER *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY

Camila Cardoso Santos

Aiming to contribute for identifying novel therapeutic alternatives to treat the silent and progressive pathology Chagas disease (CD), five novel arylimidamides (AIAs) were assayed using different tools including *in vitro*, *in silico* and *in vivo* approaches. The computational analysis predicted the AIAS 2EVK008, 27SMB078, 28SMB032, 31DAP069, 36DAP015 as no PAINS aggregators and the overall pharmacokinetic landscape favorable to all of them. *In vitro* whole cell based screenings showed that most compounds exhibited promising activity against bloodstream trypomastigotes (BT – Y strain – DTU II) and intracellular forms (β -gal tulahuen strain, DTU VI), with EC_{50} ranging 0.3-10.5 μ M, and 0.5-7.8 μ M respectively. Combined therapy of benznidazole (Bz) plus 28SMB032 using a fixed-ratio methodology was indicative of no interaction. The biological trypanocidal activity was next validated using cardiac cell cultures as hosts and intracellular forms from Y strain and found that 28SMB032 presented similar effect as Bz (about 1.5 μ M) besides high selectivity (SI= 191), encouraging us to go further with this compound *in vivo*. Unfortunately, 28SMB032 was very toxic to the mouse models of *T. cruzi* acute infection, leading to >83 % mortality in a short period of compound administration probably due to acute renal impairment. Presently, computational target prediction using *in silico* target fishing and ultrastructural approach were combined in order to explore the cellular components of bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi* affected by trypanocidal AIAs previously screened in *in vitro* studies. Our findings demonstrated that although computational analysis predicted DNA as main parasite target of the studied AIAs, no major alterations could be noticed on nuclei and mitochondrial (kDNA) nucleic acid elements of the treated parasite by ultrastructural analysis. The most frequent and

intense earlier cellular damage detected by transmission electron microscopy were distortion of Golgi apparatus, distension of plasma membrane and nuclear envelope besides the presence of large number of concentric membranes and myelin figures, in addition to endoplasmic reticulum profiles surrounding cytoplasmic components that are indicative of autophagy cell death. This mistranslation between *in vitro*, *in silico* and *in vivo* results strengths the importance of exploring different approaches during pre-clinical studies in order to contribute for drug discovery on CD therapy.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Doenças tropicais negligenciadas	20
1.2 Doença de Chagas	21
1.2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos	21
1.2.2 O ciclo de <i>T. cruzi</i>	22
1.2.3 A diversidade genética e fenotípica do parasito	23
1.2.4 Características ultraestruturais de <i>T. cruzi</i>	25
1.3 Tratamentos disponíveis para DC e susceptibilidade de <i>T. cruzi</i>	27
1.4 A busca por novos compostos	29
1.4.1 Critério de composto “hit” e “lead”	30
1.4.2 Docagem molecular	32
1.5 Terapia combinada para combate de doenças infecciosas	33
1.6 Amidinas Aromáticas	34
1.7 Justificativa	37
2. OBJETIVOS	38
2.1 Objetivo geral	38
2.2 Objetivos específicos	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	39
3.1 Estudos <i>in silico</i>	39
3.1.1 Cálculo de propriedades ADMET e análise de PAINS	39
3.1.2 Predição de alvo molecular	40
3.1.2.1 Modelagem por homologia	40
3.1.2.2 Preparação das estruturas 3D dos ligantes	40
3.1.2.3 Docagem molecular	41
3.2 Estudos <i>in vitro</i>	41
3.2.1 Celulas de mamífero e teste de citotoxicidade	41
3.2.2 Obtenção de parasitos	42
3.2.3 Ensaio de atividade tripanocida	42
3.2.4 Avaliação da terapia combinada	43

3.2.5	Determinação do índice de concentração inibitória fracional (FICI).....	44
3.2.6	Análise estrutural.....	44
3.3	Análise <i>in vivo</i>.....	45
3.3.1	Modelo de infecção.....	45
3.3.2	Esquemas de tratamento, parasitemia e taxas de mortalidade.....	45
4.	RESULTADO.....	46
4.1	Propriedades ADMET e filtragem de PAINS.....	46
4.2	Triagem fenotípica <i>in vitro</i>	47
4.3	Terapia combinada <i>in vitro</i>	50
4.4	Eficácia <i>in vivo</i>	51
4.5	Predição de alvos moleculares.....	51
4.5.1	Geração do pool de alvos de <i>T. cruzi</i>	51
4.5.2	<i>Target fishing</i>	54
4.6	Análise de MEV e MET.....	57
5.	DISCUSSÃO.....	61
6.	CONCLUSÕES.....	69
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
8.	ANEXOS.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> . Adaptado de CDC – Center for Disease Control and Prevention (2016).....	23
Figura 2	Análise ultra-estrutural por MET das formas: tripomastigota (A), amastigota (B) e epimastigota (C), evidenciando os diferentes formatos do cinetoplasto (K). Flagelo (F), Núcleo (N), Mitocôndria (M), Retículo endoplasmático (ER) e Golgi (G). Barra= 0.5 µm. Fi. Fonte das figuras B e C: Soeiro <i>et al.</i> 2010.....	27
Figura 3	Estruturas químicas dos fármacos benzonidazol (A) e do nifurtimox (B), utilizados para o tratamento da doença de Chagas.....	28
Figura 4	Exemplares das duas classes de amidinas aromáticas: diamidina aromática furamidina (DB75) e arilimidamida (DB766). Fonte: Soeiro <i>et al.</i> 2013, Fig.1 p 931.....	37
Figura 5	Atividade <i>in vitro</i> de 28SMB032 (B) e Bz (C) a 1,25 µM contra formas intracelulares de <i>T. cruzi</i> (cepa Y) em comparação com os parasitos não tratados (A). As setas pretas apontam formas amastigotas dentro da célula cardíaca. Observa-se uma diminuição no número de células infectadas e de parasito por célula para ambos os compostos. Barra=50µm.....	50
Figura 6	Distância em ângström (Å) dos átomos de nitrogênio protonados entre os grupos imino terminais (esferas verdes), indicando conservação das características bioisostéricas entre a espermidina, a pentamidina e as diamidinas aromáticas em questão.....	52
Figura 7	Modos de ligação obtidos a partir da docagem de diamidinas aromáticas dentro do sulco menor do DNA.....	56

- Figura 8 Microscopia eletrônica de varredura de TS de *T. cruzi* (cepa Y). Controle não tratado (A). O tratamento com 0,88 μM de 31DAP069 (B) 0,35 μM de 36DAP015 (C) e 10,48 μM de 28SMB032 (D) não resultou em alteração morfológica do parasito para B ou C; enquanto foi observada retração (D1-D4) e torção (D2, D3) do corpo do parasito em D. Barras = 1 μm58
- Figura 9 Efeitos ultraestruturais de AIAs em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Controle não tratado (A1-A2) mostrando morfologia característica. O tratamento com 0.88 μM 31DAP069 (B), 0.35 μM 36DAP015 (C) e 10.48 μM 28SMB032 (D) resultou em várias alterações incluindo: dilatação da bolsa flagelar (estrela negra em B1, C4 e D6); estruturas membranares concêntricas e figuras de mielina no citosol (setas pretas em B2, B3, C3 e D4); disruptura do Golgi (asterisco em C1 e D7); retículo endoplasmático (RE) envolvendo estruturas citosólicas (pontas de seta em C2 e D3); desprendimento da membrana plasmática (flechas curtas em D8) e nuclear (flechas curtas em D6). Não foram detectadas alterações nos microtúbulos subpeliculares (setas finas em D5) e no kDNA do parasito (setas duplas em D1, D2). Golgi (G), Mitocôndria (M), Núcleo (N), Flagelo (F). Barras = 500 nm.....60
- Figura S1 Gráficos de Ramachandran para alguns candidatos de *T. cruzi* obtidos por PROCHECK, mostrando os ângulos diédricos Psi e Phi de resíduos de aminoácidos. O vermelho representa as regiões mais favorecidas; amarelo representa regiões permitidas adicionais; bege representa regiões generosamente permitidas; e áreas brancas são regiões não permitidas.90

Figura S2 Estruturas 3D dos modelos de homologia selecionados (proteínas minimizadas) desenvolvidas com o servidor SWISS-MODEL.91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo das associações de doença de Chagas, distribuição geográfica, ecótopo e hospedeiro com DTUs do <i>Trypanosoma cruzi</i> (TcI a TcVI). Adaptado de Zingales <i>et al.</i> 2014 p.830.....	25
Tabela 2	Perfil do composto-alvo (TPP) para Doença de Chagas. Adaptado de Drugs for Neglected Diseases <i>initiative</i> (DNDi) 2016 http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-target-product-profile/	30
Tabela 3	Propriedades ADMET previstas <i>in silico</i> para os compostos estudados.....	47
Tabela 4	Atividade tripanocida das AIAs contras as formas tripomastigotas sanguíneas (cepa Y) e intracelulares (Tulahuen β -gal) do <i>Trypanosoma cruzi</i> , citotoxicidade em relação a L929 e seus correspondentes índices de seletividade (IS).....	48
Tabela 5	Atividade <i>in vitro</i> (EC ₅₀ s) e índice de seletividade (IS) dos compostos testados contra as formas intracelulares de <i>T. cruzi</i>	49
Tabela 6	EC ₅₀ e FICI da combinação de 28SMB032/Bz contras as formas intracelulares de Tulahuen β -galactosidase.....	50
Tabela 7	Resumo dos resultados estatísticos do modelo de homologia das proteínas de <i>T. cruzi</i>	53
Tabela 8	Resultados dos valores de docagem (kcal/mol) de amidinas com alvos de <i>T. cruzi</i>	55
Tabela S1	Detalhes dos candidatos-alvo de <i>T. cruzi</i> e informações do grid no estudo de <i>target fishing</i>	92

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADMET	Administração, Metabolismo, Excreção e Toxicidade
AIA	Arilimidamida
AT	Adenina/Timina
Bz	Benzonidazol
CC	Células cardíacas
DA	Diamidina aromática
DM	Docagem molecular
CDC	Do inglês “Center for Disease Control and Prevention”
CYP	Citocromo P450
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Do inglês “deoxyribonucleic acid”
DNDi	Do inglês “Drugs for Neglected Diseases Initiative”
dpi	Dia pós infecção
DTU	Do inglês “Discrete Typing Unit”
DTN	Doença Tropical Negligenciada
EC ₅₀	Concentração mínima de 50% de eficácia
Ex	Exemplo
FICI	Do inglês “Fractional Inhibitory Concentration Index”
FT	Farnesiltransferase
h	Hora
hERG	Do inglês “Human ether-a-go-go-related gene”
i.p.	Intraperitoneal
IC	Intervalo de Confiança
IFT	Inibidores da farnesiltransferase
IS	Índice de seletividade

KDNA	DNA do cinetoplasto
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
LC50	Limiar de toxicidade
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Nif	Nifurtimox
NOAEL	Do inglês “no-observed-adverse-effect-level”
NO	Do inglês “Nitric oxide”
NOS	Do inglês “Nitric oxide sythase”
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAINS	Do inglês “Pan-assay Interference compounds”
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDB	Do inglês “Protein Data Bank”
pKa	Constante de ionização de ácidos
Pt	Pentamidina
SdpS	Do inglês “Spermidine synthase”
SEM	Do inglês “Standard ErrorMean”
SMILES	Do inglês “Simplified Molecular Input Line Entry Specification”
TC	Terapia Combinada
TS	Tripomastigota sanguínea
TPP	Do inglês Target Product Profile
v.o.	Via oral

1. INTRODUÇÃO

1.1 Doenças tropicais negligenciadas

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) prevalecem em regiões tropicais e subtropicais em 149 países afetando, segundo a Organização das Nações Unidas, 13% da população mundial. As DTNs predominam em populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em estreito contato com vetores, gado e animais domésticos infectados (Hotez *et al.* 2010, Hotez&Fujiwara 2014). Estima-se que 500 milhões de crianças estejam afetadas pelas DTNs com um custo anual de bilhões de dólares para as economias de países em desenvolvimento (WHO 2010 a).

As DTNs são compostas principalmente por infecções virais, bacterianas, além daquelas causadas por protozoários e helmintos. As mais relevantes reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) são: dengue, raiva, tracoma, úlcera de Buruli, treponematoses endêmicas, lepra, tripanossomíase africana, leishmanioses, teníase / cisticercose, dracunculose, equinococose, trematodíases de origem alimentar, filariose linfática, a oncocercose, esquistossomose e helmintíases transmitidas pelo solo, além da doença de Chagas (DC) (Hotez 2013, WHO 2010b, 2013).

A pobreza é um fator social fundamental para a disseminação descontrolada das DTNs e pode levar a redução da produtividade econômica devido a uma gama de questões relacionadas à saúde como, por exemplo, desabilidade e morbidade a longo prazo e questões materno-fetais, dentre outras que levam os portadores e suas comunidades a permanecerem nesta armadilha da pobreza (Conteh *et al.* 2010). O impacto das DTNs tem sido associado com amplas rupturas sociais incluindo instabilidade política, conflitos civis, estigmatização e desestabilização de comunidades locais (Mackey *et al.* 2014). No caso de DC, a relação direta de pobreza e a transmissão de *T. cruzi* pode ser destacada pela baixa qualidade das moradias das áreas endêmicas, facilitando a domiciliação dos vetores (e assim exposição ao agente transmissor), assim como falta de assistência médica e de acompanhamento pré-natal (Hotez *et al.* 2013).

Há ainda uma grande diferença na quantidade de fármacos desenvolvidos para o combate das DTNs em relação a outras patologias. Embora as doenças

tropicais e a tuberculose sejam responsáveis por 12% da carga global de doenças, apenas 21 dos 1.556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004 foram desenvolvidos especificamente para elas (Chirac & Torreele 2006). Uma das razões para este desigual quadro é o baixo interesse da maioria das indústrias farmacêuticas decorrente do reduzido retorno lucrativo uma vez que a população atingida é de baixa renda e em sua grande maioria de países em desenvolvimento.

Em contrapartida, iniciativas público-privadas têm sido realizadas visando padronizar, fomentar e otimizar o desenvolvimento de novos fármacos para as DTNs, lançando mão de tecnologias de ponta e desenho racional de novas alternativas terapêuticas (Chatelain 2015, Katsuno 2015).

Ainda assim, muitos foram os avanços alcançados para DC. A transmissão de *T. cruzi* pelas principais espécies vetoriais de triatomíneos foi drasticamente reduzida em países como Brasil, Chile, Guatemala e Uruguai, a Argentina, El Salvador, Honduras, Paraguai, Peru e México com algumas exceções regionais. Em todas as regiões, houve uma redução drástica de número de casos agudos e triatomíneos intradomiciliares. A estimativa de óbitos anuais diminuiu globalmente de 45.000 para 11.000 em 2008. O número estimado de portadores diminuiu de 30 milhões em 1990 para 8 milhões em 2006. A incidência anual durante este período de 16 anos diminuiu de 700.000 para 56.000. Entretanto, sabe-se que o número de infectados por si só considerável é subestimado e que a transmissão vetorial, menos relevante na atualidade, ainda ocorre e perpetua o ciclo da DC (WHOc 2010).

1.2 Doença de chagas

1.2.1 Aspectos clínicos e epidemiológicos

Em 1909, a DC foi descrita em um pequeno lugarejo de Minas Gerais chamado Lassance pelo médico e pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz, Carlos Justiniano Ribeiro Chagas. Carlos Chagas ainda reportou o protozoário causador da doença, *Trypanosoma cruzi*, além de seu vetor, hemípteros da sub-família Triatominae conhecidos vulgarmente pelo nome de “barbeiros”. A doença é caracterizada por uma fase aguda curta, assintomática/oligosintomática de parasitemia elevada (até oito semanas), seguida de uma longa fase crônica progressiva e altamente incapacitante.

Há uma estimativa de mais de 6 milhões de pessoas portadoras da DC (Pullan *et al.* 2014, WHO 2015), sendo que cerca de 30-40% poderão desenvolver alterações cardíacas e ou digestivas, e em menor proporcionalidade, neurológicas. Menos de 1% tem acesso a diagnóstico e tratamento (Pecoul *et al.* 2016). A DC é responsável por aproximadamente 14 mil óbitos anuais na América Latina, região na qual DC é endêmica, matando mais pessoas do que qualquer outra doença parasitária. Uma perda total de 528,000 anos de vida (DALYs) são atribuídos a esta patologia resultantes de mortes prematuras e/ou incapacidades (Coura & Dias 2009, Hotez *et al.* 2010), causando um grande impacto econômico e social. Segundo estimativa da OMS em 2010, mais da metade de portadores da DC vivem na Argentina, Brasil e México. Bolívia tem a maior prevalência, com estimativa de 607.186 casos (WHO 2010 a,b).

Um número crescente de portadores tem sido também observados em países não endêmicos da América do Norte, Ásia e Europa principalmente decorrente a migração populacional de portadores para estas áreas embora casos autóctones também têm sido citados (Pecoul *et al.* 2016). Há uma estimativa de aproximadamente 300,000 portadores nos EUA, ainda que fontes alternativas apontem para mais de 250,000 casos somente no Texas (Hotez *et al.* 2013). Estes são números que alertam para a agravante situação da globalização desta parasitose.

1.2.2 O ciclo de *T. cruzi*

T. cruzi é um parasito digenético, alternando seu ciclo entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos) e hospedeiros vertebrados (mamíferos, incluindo seres humanos). O parasito apresenta um ciclo (Figura 1) com distintas formas classificadas morfológicamente quanto à posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região de emergência do flagelo: epimastigota (forma flagelada, replicativa no intestino do inseto e não infectante), tripomastigota (forma flagelada, não replicativa, infectante e presente em ambos hospedeiros vertebrados e invertebrados) e amastigota (forma com curto flagelo, replicativa, presente nos mamíferos e com potencial de infecção) (Brener 1973, de Souza 2010).

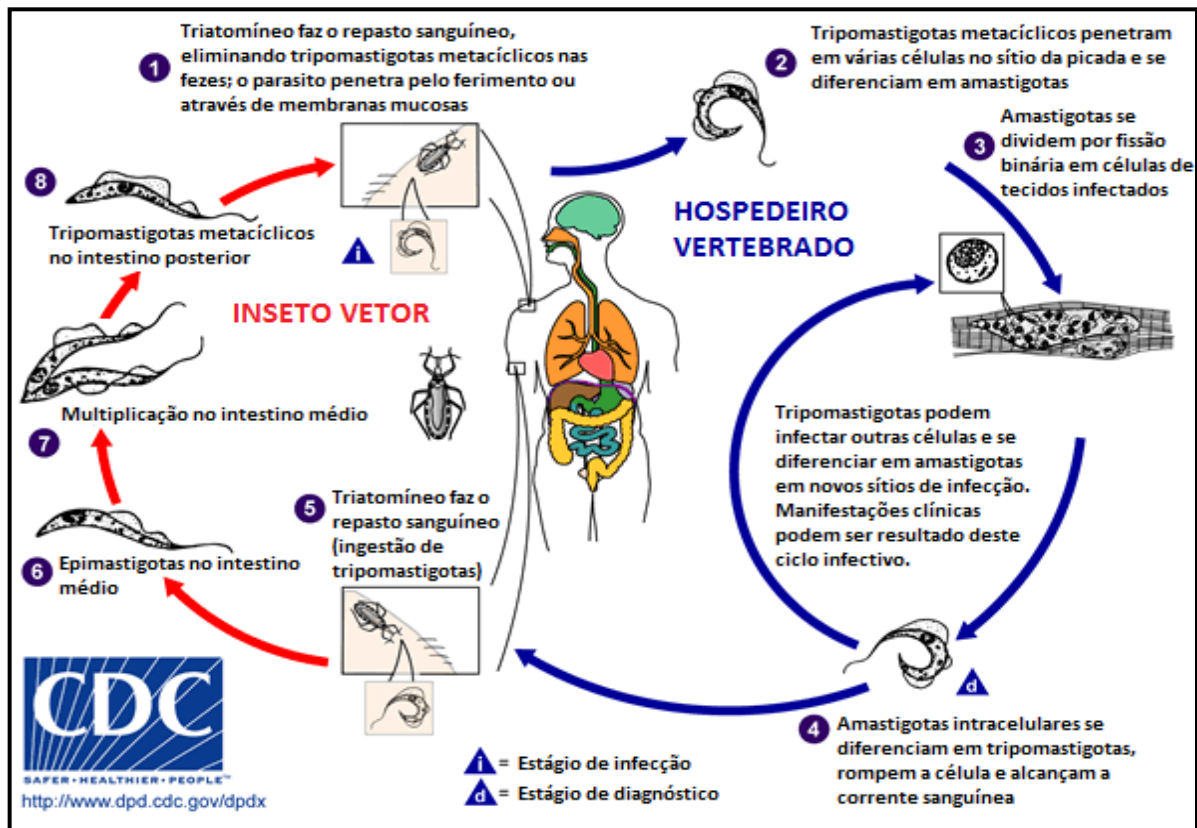


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida de *T. cruzi*. Adaptado de CDC – Center for Disease Control and Prevention (2016).

A transmissão do parasito se dá por diferentes vias (transfusional, vertical, ingestão de alimentos, acidentes), mas de modo primário por via vetorial, através do contato com as fezes/urina de triatomíneos hematófagos infectados após repasto sanguíneo.

1.2.3 A diversidade genética e fenotípica do parasito

As características genóticas somadas aos seus distintos perfis biológicos (Zingales *et al.* 2009, Miles *et al.* 2009, Guhl & Ramírez 2011, Zingales *et al.* 2012) resultaram no agrupamento das cepas de *T. cruzi* em seis grandes arranjos denominados unidades discretas de tipagem (DTUs): TcI a TcVI. Como mostrado na tabela 1, as DTUs TcI, TcII, TcV and TcVI são agentes de doença humana, com alta prevalência em diferentes regiões da América Latina (Miles *et al.* 2009, Guhl & Ramírez 2011, Zingales *et al.* 2012). TcI é mais relevante na região amazônica, região Andina, América Central e México e suas principais manifestações clínicas

incluem cardiomiopatia chagásica e casos severos de meningoencefalite em hospedeiros imunocomprometidos. Na região do Cone Sul da América do Sul prevalecem as DTUs TcII, TcV e TcVI associadas na maioria dos casos as alterações cardíacas severas além de ocorrência das síndromes megas (megaeesôfago e megacólon) (Zingales *et al.* 2012). TcIII está associada com o ciclo silvestre no Brasil e em países adjacentes, sendo raros os casos documentados de infecções humanas. Infecções humanas de TcIV são esporádicas na Venezuela e incomuns em outros países (Zingales *et al.* 2012).

Estudos tem também demonstrado importante variabilidade das diferentes cepas do parasito quanto ao perfil de susceptibilidade/resistência natural frente aos medicamentos atuais (nitroderivados benznidazol e nifurtimox) em portadores e em modelos murinos (Filardi & Brener 1987, Teston *et al.* 2013). Portanto, é importante que se leve em consideração a diversidade das cepas e DTUs de *T. cruzi* nos estudos a cerca de seus aspectos patológicos, biológicos, moleculares, protômicos assim como nos ensaios de desenvolvimento de novas terapias alternativas (Zingales *et al.* 2015).

Tabela 1. Resumo das associações de doença de Chagas, distribuição geográfica, ecótopo e hospedeiro com DTUs de *Trypanosoma cruzi* (TcI a TcVI). Adaptado de Zingales *et al.* 2014 p.830.

TcI	Principais agentes na região nordeste da América Latina e Amazônia. Amplamente encontrados em ciclos silvestres em outras áreas. Presença em diversos reservatórios silvestres, especialmente em gambás (<i>Didelphis</i>). Altamente diversificado geneticamente.
TcII	Principal no Brasil central e Atlântico, sendo ocasionalmente identificado na região norte. Muitos reservatórios silvestres têm sido reportados, mas espécies de hospedeiros no ciclo silvestre não são totalmente conhecidas.
TcIII	Raro em infecções humanas, esporádico em cães. Reservatórios silvestres escavadores, principalmente tatu na América do Sul. Alguns isolados têm sido descritos como infectivos experimentalmente (camundongo). Diversificado geneticamente.
TcIV	Agente secundário da DC na Venezuela. Reservatórios arbóreos (primatas e guaxinins) e terrestres. Associado a ciclo silvestre juntamente com TcI na América do Norte.
TcV e TcVI	Agentes comuns na região do Gran Chaco/ Cone Sul. Raramente associados ao ciclo silvestre. Possíveis origens antropogênicas ou peridomésticas. Ambos geneticamente conservados. Híbridos recentes de TcII e TcIII

1.2.4 Características ultraestruturais de *T. cruzi*

O protozoário *T. cruzi* foi um dos primeiros patógenos a serem observados pela microscopia eletrônica (ME) e continua sendo intensamente analisado por esta abordagem ultraestrutural, permitindo a identificação das principais características morfológicas e estruturais nas suas diferentes formas (de Souza 2009). Dentre as múltiplas técnicas as mais frequentes incluem a microscopia eletrônica de transmissão (MET) que permite a identificação de compartimentos/organelas intracelulares (além de componentes da superfície celular como membrana plasmática) pela análise de cortes ultrafinos de amostras emblocadas e polimerizadas em resina; e a microscopia eletrônica de varredura (MEV): que possibilita uma análise morfológica e topológica da superfície celular do parasito (Soeiro *et al.* 2010). Além das organelas comuns a eucariotos, outras estruturas (ex. microtúbulos subpeliculares, flagelo, mitocôndria única e ramificada com compactação do DNA (kDNA) em estrutura característica denominada cinetoplasto são características que permitem a identificação ultraestrutural de *T. cruzi*. Na figura

2 observamos: flagelo (F), formado por uma estrutura contrátil denominada axonema composta de 10 pares de microtúbulos, 9 periféricos e 1 central; inclusões lipídicas (IL): representadas por formas circulares eletrondensas; núcleo (N); Golgi (G); retículo endoplasmático (ER); mitocôndria (M) única e altamente ramificada com kDNA (k). O kDNA varia no formato dependendo da forma do parasito: em forma de bastão para epimastigotas e amastigotas e formato de cesto para tripomastigotas (de Souza 1999, de Souza 2009). Há outras estruturas não exemplificadas na figura 2 tais como: microtúbulos subpeliculares; glicosomos, que se assemelham aos peroxissomos e acidocalcissomas, estruturas vacuolares contendo materiais eletrondensos ricos em polifosfatos e cálcio além de outros elementos.

A MET representa uma abordagem que pode ser utilizada para evidenciar a organização estrutural e os danos celulares em parasitos e células hospedeiras expostas a diferentes estímulos farmacológicos (Soeiro *et al.* 2010). A MEV permite a análise da superfície e topologia celular e suas possíveis alterações frente a incubação (de parasitos ou qualquer amostra biológica) com diferentes candidatos a fármacos. Importante destacar que as alterações ultraestruturais observadas devem levar em consideração o tempo de exposição, a concentração e natureza dos compostos a serem avaliados sendo sempre comparativas as amostras controle (ausência do composto teste ou uso de controle positivo com exposição de fármaco de referência, por exemplo). Assim, busca-se por esta ferramenta metodológica identificar danos celulares mais frequentes e precoces deflagrados pelos agentes farmacológicos/candidatos e que podem ser decorrentes de eventos primários e / ou secundários sobre os seus componentes elementares e/ou vias metabólicas (lipídios, carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, entre outros) impactando sobre as propriedades biológicas e funcionais do parasito (Soeiro *et al.* 2010, Menezes *et al.* 2006).

Estas ferramentas metodológicas somadas a outras tecnologias experimentais (ex. achados bioquímicos, proteômicos, uso de marcadores moleculares e avaliação por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência) permitem estudar aspectos e vias relacionadas à morte celular (programada (PCD) ou passiva) provocados por uma entidade química através da determinação de um conjunto de características, como por exemplo, na apoptose (fragmentação do DNA mitocondrial e nuclear, exposição de fosfatidilserina, depolarização de membrana mitocondrial, manutenção de integridade de membrana plasmática, retração celular, brotamento de

vesículas/membrana entre outras), autofagia (grande número de vesículas e lisossomas, presença de degradação de membranas biológicas (figuras de mielina), grande número de perfis de retículo endoplasmático envolvendo elementos celulares, entre outras) e necrose (alteração/ ruptura da integridade da membrana plasmática com extravasamento de conteúdo citoplasmático, destruição de organelas celulares, entre outras) (Menna-Barreto *et al.* 2009, Soeiro & de Souza 2007).

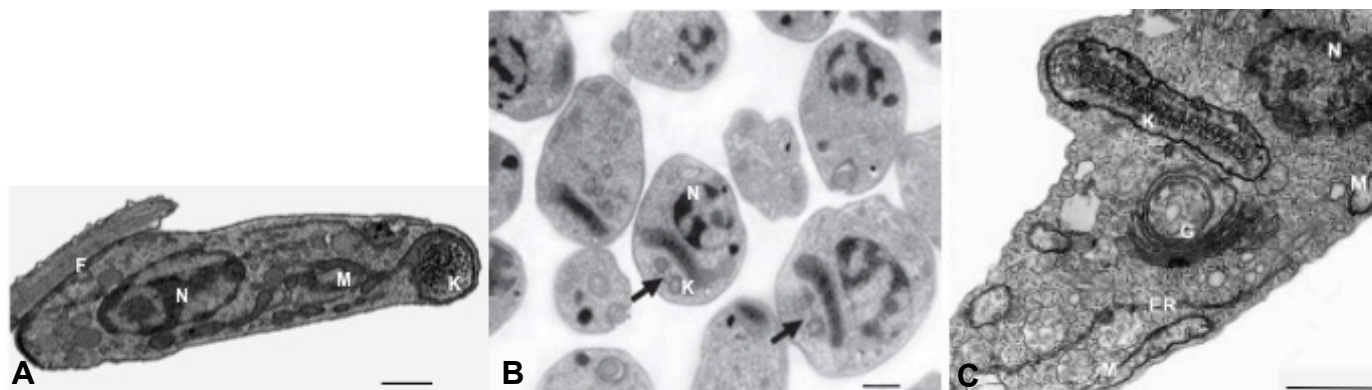


Figura 2. Análise ultra-estrutural por MET das formas: tripomastigota (A), amastigota (B) e epimastigota (C), evidenciando os diferentes formatos do cinetoplasto (K). Flagelo (F), Núcleo (N), Mitocôndria (M), Retículo endoplasmático (ER) e Golgi (G). Barra= 0.5 μ m

Fi. Fonte das figuras B: Bambino-Medeiros *et al.* 2011 e C: Soeiro *et al.* 2010.

1.3 Tratamentos disponíveis para DC e susceptibilidade de *T. cruzi*

Há mais de 40 anos os nitroderivados nifurtimox (Nif) (5-nitrofurane, Bayer 2502; Bayer, Alemanha) e benzonidazol (Bz) (2-nitroimidazole; Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco [LAFEPE], Brasil, ELEA/Mundo Sano, Argentina) (Figura 3) vem sendo os medicamentos utilizados para o tratamento de DC, embora no Brasil haja somente a disponibilidade do Bz. Desde 2011 a formulação pediátrica do Bz tem sido implementada pelo LAFEPE, diminuindo os riscos de administrações incorretas do medicamento às crianças acometidas por DC.

Durante o processo de bioativação destas pro-drogas dá-se a formação de metabólitos reativos como os radicais RNO_2^- e hidronitroxila (RNHO) para Nif e Bz respectivamente, gerando um ambiente toxico para o parasito. As reações do RNO_2^- com oxigênio podem gerar ânion superóxido O_2^- após ciclos de oxiredução. Já o RNHO é oriundo de um processo nitroreduutivo seguido pela formação de amino derivados correspondentes durante a biotransformação (Castro *et al.* 2006). Mais

recentemente, foi caracterizada uma nitrorredutase tipo I insensível a oxigênio, que utiliza NADH como cofator, responsável pela ativação de Bz e Nif no parasito (Hall & Wilkinson 2012). Ambos os fármacos são recomendados para fases aguda e crônica recente além de casos de reativação da doença, porém produzem resultados variáveis (especialmente decorrente de cepas naturalmente resistentes a nitroderivados). Esta diferença de susceptibilidade a estes nitroderivados (Bz e Nif) para diversas cepas de *T. cruzi* isoladas de diferentes hospedeiros e áreas geográficas está bem documentada em estudos prévios (Filardi & Brener 1987, Murta *et al.* 1998). A resistência do parasito aos nitroderivados tem sido relacionada a diferenças quanto à expressão de nitroredutases do tipo I responsáveis pela ativação dos mesmos (Campos *et al.* 2014). A família de enzimas superóxido desmutases também contribui para o fenótipo de resistência aos nitroderivados, já que atuam na remoção do excesso de O_2^- gerado pelo estresse oxidativo (Nogueira *et al.* 2006). A proteína TCOYE “old yellow enzyme” importante para a geração de radicais tóxicos para o parasito parece desempenhar um papel no perfil de resistência ao Bz (Murta *et al.* 2006). As proteínas de membrana ABC são transportadores unidirecionais de uma variedade de moléculas, e podem estar relacionadas com o efluxo dos compostos (Zingales *et al.* 2015). Estes são exemplos pontuais, mas é esperado e foi demonstrado que mecanismos distintos agem em conjunto para gerar este fenótipo de resistência (Campos *et al.* 2014).

Assim, dentre as principais limitações dos atuais fármacos para DC, destacamos (a) baixa eficácia durante a fase crônica tardia, (b) longos períodos de tratamento (até 60 dias), (c) ocorrência de cepas do parasito naturalmente resistente a nitroderivados além de (d) graves efeitos colaterais como anorexia, depressões psíquicas e convulsão (Coura & Castro 2002, Soeiro & Castro 2009). Para ambos os fármacos, as alterações cutâneas e neurológicas (polineurites) estão entre as mais frequentes e que muitas vezes resultam no abandono do tratamento (Rassi & Marin-Neto 2014).

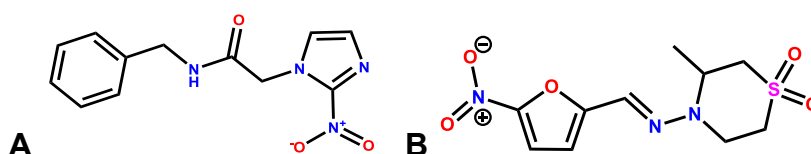


Figura 3. Estruturas químicas dos fármacos benzonidazol (A) e do nifurtimox (B), utilizados para o tratamento da doença de Chagas.

1.4 A busca por novos compostos

O perfil de composto alvo (TPP) representa o conjunto de características mínimas (aceitáveis) ou as ideais a serem contempladas na busca por um novo medicamento. Estas características são estruturadas a partir de vários fatores incluindo atual conhecimento sobre a patologia e seus fatores determinantes, população acometida, além da experiência acumulativa dos estudos pré-clínicos e clínicos. Os TPPs ajudam a nortear a comunidade científica e indústria farmacêutica a atuar de forma mais otimizada, reprodutível, padronizada e direcionada visando alcance de objetivos (novos medicamentos), redução de custos e tempo de desenvolvimento do novo produto (Chatelain & Ioset 2011).

Um composto ideal para o tratamento de DC deveria atender as seguintes exigências de acordo com seu perfil de produto alvo (TPP): (I) cura parasitológica de casos crônicos, agudos e quadros de reativação, (II) efetividade em única ou poucas doses (III) baixo custo garantindo acessibilidade aos pacientes, (IV) ausência /ou baixa incidência de efeitos colaterais ou teratogênicos / mutagênicos, (V) sem necessidade de hospitalização para o tratamento, (VI) sem indução de resistência, (VII) não possuir potencial pró-arritmico, (VIII) possibilitar doses administradas via oral e em menos de 30 dias de tratamento e adaptadas para a idade do paciente, (IX) ter validade mínima de 5 anos e menor custo possível de produção, como descrito na tabela 2.

Para alcance destas metas há necessidade de maior investimento em pesquisas envolvendo a busca de alternativas para o tratamento de patologias integrantes do grupo de doenças negligenciadas como a DC. Iniciativas público-privadas têm unido esforços para a otimização da descoberta de compostos promissores para estas patologias

Tabela 2. Perfil do composto-alvo (TPP) para Doença de Chagas. Adaptado de Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi) 2016 <http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/chagas-target-product-profile/>.

	Aceitável	Ideal
População alvo	Crônica	Crônica e aguda
Distribuição geográfica	Todas as regiões	Todas as regiões
Eficácia	Não inferior a dose-padrão de Bz * em todas as regiões	Superioridade a Dose-padrão de Bz em fases diferentes da doença (aguda e crônica) (parasitológica)
Segurança	Superioridade ao Bz* na frequência de tratamentos definitivos descontinuados por indicação médica (clínica ou laboratorial) **	Superioridade ao Bz* na frequência de tratamentos definitivos descontinuados por indicação médica (clínica ou laboratorial) **
Contraindicações	Gravidez	Sem contra indicações
Precauções	Sem genotoxicidade**; sem potencial pro-arrítmico	Sem genotoxicidade; não teratogênica; sem potencial pro-arrítmico
Interações	Sem interações clínicas significativas com fármacos antiarrítmicos e anticoagulantes	Sem interações clínicas significativas
Apresentação	Oral/Parenteral (short POC)*** Adaptada a idade	Oral Adaptada a idade
Estabilidade	3 anos, zona climática IV	5 anos, zona climática IV
Regime de dose	Oral – qualquer duração Parenteral – <7 dias	<30 dias
Custo	O mais baixo possível	Semelhante aos tratamentos recorrentes

* Por recomendação da WHO, ** sem genotoxicidade como condição única para novas entidades químicas, *** tratamento parenteral em caso de doença severa.

1.4.1 Critérios de compostos “hit” e “lead”

Com o intuito de ampliar a possibilidade de sucesso na identificação e produção de novos fármacos, características mínimas e filtros devem ser observados para cada tipo de protótipo visando a progressão dos candidatos ao longo dos ensaios pré-clínicos e clínicos (Khanna 2012). O estabelecimento destes rigorosos parâmetros resultam de critérios discutidos e continuamente reavaliados pelos diversos atores envolvidos (natureza pública, privada, não governamental como DNDi e mesmo pelas indústrias farmacêuticas) incluindo grupos de pesquisa, inovação e desenvolvimento tecnológico, médicos, farmacêuticos, bioquímicos, químicos medicinais, biólogos, parasitologistas, entre outras modalidades, tendo por

base o conhecimento atualizado acerca da patologia alvo e dos resultados alcançados nos estudos clínicos e experimentais. Assim, se faz necessário a atualização dos conceitos e saberes acadêmicos, médicos e tecnológicos, a padronização de metodologias visando garantir qualidade dos ensaios e reprodutibilidade, alcançar parâmetros de eficácia e segurança através da determinação de janelas terapêuticas (em progressão de etapas sequenciais) que variam de acordo com cada patologia, seu público alvo e estadiamento (Nwaka & Hudson 2006). Isto é essencial quando se leva em consideração as DTNs, que recebem menos recurso para pesquisa quando comparadas às demais. Um dos exemplos que podemos citar refere-se a DC. *T. cruzi* tem a habilidade de parasitar qualquer célula nucleada mantendo perfil dinâmico e sistêmico de infecção. Portanto, compostos (como os azóis inibidores da biossíntese de ergosterol – posaconazole e ravuconazole) que atingem somente ou majoritariamente as formas replicativas do parasito, podem resultar em falhas terapêuticas por não serem ativos sobre formas não-replicativas (no caso tripomastigotas) capazes de manter a infecção mesmo após o final do tratamento (Chatelain 2015).

Nos estudos pré-clínicos para identificação de novas terapias para DC, o fármaco de referência Bz é utilizado como base comparativa para os critérios de definição de um agente “hit” (etapa 1) e de um composto “lead” ou líder (etapa 2). Desta forma, na etapa 1, o composto “hit” deve apresentar através de ensaios *in vitro*, concentração que diminui em 50% o número de parasitos ($EC_{50} \leq 10 \mu\text{M}$) para as formas intracelulares de *T. cruzi* (ex. cepas representativas de TcVI (como a Tulahuen) e TcII (como a Y) sendo ainda 10 vezes mais seletivos aos parasitos em detrimento das células de mamífero. Na etapa 2 (compostos líder) além das propriedades farmacológicas e físico-químicas desejáveis para um novo medicamento, o composto tripanocida deve se exibir eficácia e correspondente seletividade pelo menos dez vezes maior que na etapa 1 ou seja $EC_{50} \leq 1 \mu\text{M}$ e seletividade de 100 (Don & Ioset 2013). Outro critério fundamental para identificação do perfil de composto líder na etapa 2 relaciona-se a ação *in vivo* sobre modelos experimentais. Em modelos murinho de infecção aguda espera-se alcançar minimamente redução de 80% nos níveis parasitêmicos além de aumento de sobrevivência frente a um tratamento de até 10 doses de 50 mg/kg administradas preferencialmente por via oral (Katsuno *et al.* 2015).

Além dos estudos de eficácia, estudos farmacológicos (farmacocinética e farmacodinâmica - PK e PD), de metabolismo (ADMET- administração, metabolismo, excreção e toxicidade), propriedades físico-químicas, toxicologia e validação de alvos devem ser contemplados nos critérios de determinação e progressão de compostos “hit” e líder. Neste sentido, análises computacionais são ferramentas importantes para predições iniciais de comportamento molecular, servindo como recursos complementares de modelos celulares como também de suporte adicional na identificação e otimização de composto líder (Wale *et al.* 2009, Keenan *et al.* 2013, Wadood *et al.* 2013; Sacconay *et al.* 2014, Chatelain 2015). Dentre as características farmacológicas dos novos candidatos as propriedades de ADMET devem ser avaliadas (inicialmente pelo menos em estudos de modelos preditivos) através de seu potencial quanto: permeabilidade de membrana (se são capazes de cruzar as barreiras hemato-encefálica e do epitélio do trato digestório e intestinal), inibição da família de citocromos (CYP3A4), perfil de mutagenicidade (ex. ensaio de micronúcleo) e genotoxicidade (teste de Ames, que se baseia na reversibilidade de mutações pontuais em bactérias), segurança cardíaca (bloqueio do canal hERG), de estabilidade metabólica (microsomas de roedores e de células humana), entre outros (Don & Ioset 2013, Katsuno *et al.* 2015). Também, é aconselhável que os compostos se enquadrem nas regras de Lipinski, além de passarem por filtros para exclusão de comportamentos promíscuos (ex. análise de “Pan-assay Interference compounds” denominados de PAINS) e eliminação precoce de dados falso-positivos (Baell & Holloway 2010, Don & Ioset 2013).

1.4.2 Docagem molecular

“Target fishing” é uma tecnologia emergente que permite a predição de alvos biológicos baseados em estrutura química de moléculas, utilizando informações de bases de dados químicas e biológicas presentes na literatura (Jenkins *et al.* 2006, Schomburg *et al.* 2016, Cereto-Massagué *et al.* 2015). Para saber assim o provável complexo de interação da molécula teste (candidato a fármaco) ao seu alvo *in vivo*, informações 3D sobre o perfil de interação de alvos preditivos e a estrutura química dos compostos são utilizadas. Nestes estudos de docagem molecular (DM) do ligante ao alvo, pode-se inferir o modo de ligação predominante e a energia na qual o complexo atinge sua estabilidade, denominada energia de docagem. Por isso, o

estabelecimento de estruturas para docagem é tão importante quanto a análise em si (Jenkins *et al.* 2006).

Assim, a DM é uma ferramenta computacional importante para biologia molecular estrutural e desenho de novos fármacos. Este método pesquisa de forma efetiva espaços altamente dimensionais e usa uma função de pontuação (score) que ranqueia os candidatos da docagem. Este modelo pode ser utilizado para fazer triagem virtual em uma ampla biblioteca de compostos, ranqueando resultados e propondo hipóteses estruturais de como os ligantes inibem os alvos, o que é essencial para a otimização de compostos líderes (Sacconay *et al.* 2014, Chatelain 2015). Muitos estudos têm sido realizados nesta área e podemos destacar um deles conduzido em *T. cruzi* que foi a análise feita por Rogers e colaboradores (2012), que através da triagem virtual fez a predição de compostos com potencial de associação específica a principal cisteína-proteinase deste parasito, denominada de cruzaina, e que é essencial em todas as etapas do ciclo deste parasito. De forma semelhante, Sacconay e colaboradores (2014) utilizou da mesma abordagem para predizer, a partir de uma biblioteca de compostos fito químicos purificados, quais teriam maior afinidade pela proteína sirtuina, obtendo as estruturas tridimensionais de variações da mesma através de modelagem por homologia.

1.5 Terapia combinada para combate de doenças infecciosas

A terapia combinada consiste no uso de mais de uma modalidade ou medicamento para tratar uma patologia. Esta pode ser fonte de varias vantagens, tais como maior efetividade de tratamento através: da utilização de máxima dosagem em caso de não sobreposição de toxicidade; além da atuação por diferentes mecanismos de ação reduzindo assim perspectivas de desenvolvimento de resistência aos quimioterápicos (Lee *et al.* 2010). Apesar de ser mais onerosa que a monoterapia em primeira instância, a combinação de fármacos oferece uma série de redução de custos devido à menor taxa de: falha terapêutica, letalidade, efeitos colaterais e desenvolvimento de resistência (Bozic *et al.* 2013). No final da década de 50, a introdução de terapia combinada cíclica para leucemia linfática infantil foi um marco na melhora da eficácia do tratamento contra as doenças neoplásicas (Pui *et al.* 2013). Em relação às doenças infecciosas, tuberculose,

hanseníase, malária e síndrome da imunodeficiência adquirida são alguns exemplos de patologias tratadas com administração combinada de fármacos como preconizado pela OMS, reduzindo o desenvolvimento de resistência aos tratamentos em relação às monoterapias. Como demonstrado no relatório anual do DNDi em 2015, estudos de terapia combinada fase clínica III relacionados à leishmaniose visceral com diferentes combinações de AmBisome®, miltefosina e paromomicina conduzidos em 602 pacientes de Bangladesh (2010-2014) demonstraram excelentes resultados de cura e tolerância, dando suporte às mudanças na política de tratamento da doença. Regimes alternativos de Bz em combinação com fosravuconazol para DC também tem sido recentemente avaliados pelo DNDi e estudos de fase II estão planejados para começar em breve. Em 2015, o protocolo do estudo foi estabelecido em relação às doses e combinações (ou não) dos fármacos e o recrutamento de pacientes iniciado em 2016 (Drugs for Neglected Diseases Initiative- Annual report 2015).

1.6 Amidinas Aromáticas

A Pentamidina (Pt) é um análogo de insulina sintetizado há mais de 70 anos e que continua em uso para tratamento do estágio inicial de tripanossomíase africana e Leishmanioses resistentes a antimoniais. Apesar da notável ação antiparasitária, as principais limitações para o uso deste fármaco incluem a baixa disponibilidade oral (devido ao alto valor de pKa do grupo funcional amino (10 - 12)), necessidade da administração via parenteral, além de questões relativas a toxicidade e aos longos períodos de tratamento (Jones *et al.* 1993, Soeiro *et al.* 2013a). A parafuramidina (DB289), pro-droga da furamidina (DB75), chegou à fase clínica III para a tripanossomíase americana, mas foi descontinuada devido à toxicidade renal (Paine *et al.* 2010). Assim visando manter a potência destas moléculas aromáticas, mas reduzir toxicidade e promover características farmacológicas mais favoráveis (ex. administração oral), vários grupos de química medicinal têm trabalhado na síntese de novos derivados que têm sido testados sobre diversos modelos. Em relação à atividade anti- *T. cruzi*, nosso laboratório tem atuado nesta linha de pesquisa através de colaborações com pesquisadores das universidades da Georgia e da Carolina do Norte, Estados Unidos da América.

Resultados encorajadores foram obtidos através de experimentos *in vitro* e *in vivo* os quais serão brevemente explorados nos próximos parágrafos.

As primeiras moléculas amidínicas estudadas pelo nosso grupo foram a DB75 e sua análoga, DB569 frente à substituição do grupo imino terminal por um fenila (De Souza *et al.* 2004). Observamos que a substituição promoveu ação anti-parasitária sobre infecção *in vitro* por *T. cruzi* e por *Leishmania amazonensis* porém não foi capaz de suprimir completamente o parasitismo *in vivo* (De Souza *et al.* 2004, 2005). A partir destes estudos, dezenas de séries foram testadas sobre infecção *in vitro* e *in vivo* por *T. cruzi* explorando diferentes alterações nas moléculas aromáticas incluindo número de grupamentos catiônicos terminais e tipo de associação ao anel arila (Soeiro *et al.* 2013a). Das diversas mudanças estruturais testadas, a que resultou na melhor potencia foi a inclusão de um átomo de nitrogênio mediando a associação do grupo imino ao anel aromático. Esta nova classe de moléculas inicialmente chamadas de amidinas reversas e hoje denominadas de arilimidamidas (AIAs) possuem menores valores de pKa (7-8) em relação as amidinas clássicas (>10) exibindo melhor biodisponibilidade, devido aumento da permeabilidade à membranas biológicas (Soeiro *et al.* 2013a, Werbovetz 2006).

AIAs exibem alta potência e seletividade contra diferentes parasitos que afetam humanos, evidenciada em estudos utilizando modelos de infecção por patógenos intracelulares como *Leishmania spp* e *T. cruzi in vitro* (Rosypal *et al.* 2008, Pacheco *et al.* 2009, Timm *et al.* 2014) e *in vivo* (da Silva *et al.* 2008, Batista *et al.* 2010, Wang *et al.* 2010). AIAs tem sido investigadas também sobre outros parasitos de interesse veterinário que podem levar a perdas econômicas significativas como *Neospora caninum* (Schorer *et al.* 2012), levando a um quadro de aborto em bovinos e *Besnoitia besnoiti* (Cortes *et al.* 2011) causadora de uma alta mortalidade e morbidade em gado no sul da Europa, dentre outras.

Dados anteriores do nosso grupo revelaram que o número de grupos terminais das AIAs pode influenciar na sua potência tripanocida. Em um estudo recente observamos que de uma série de 15 moléculas todas as 6 *bis*-arilimidaminas foram mais potentes que as 9 mono-AIAs testadas *in vitro* (de Araújo *et al.* 2014). A DB766 é um exemplo de *bis*-AIA promissora, exibindo EC₅₀ na faixa de nanomolar (60 nM), sendo 260 vezes mais potente que a DB75, ambas representadas na figura 4 (de Souza *et al.* 2007). Esta AIA exibiu potente atividade contra amastigotas intracelulares e formas sanguíneas de *T. cruzi* e sobre várias

cepas, inclusive aquelas naturalmente resistentes a nitroderivados (Bz e Nf) como a YuYu e Colombiana (Batista *et al.* 2010a). O elevado índice de seletividade (IS >533) em associação as características farmacológicas favoráveis encorajou o prosseguimento para atividade *in vivo* e os dados mostraram que esta *bis*-AIA foi capaz de suprimir a carga parasitária no sangue e tecido cardíaco em 80->99%, quando modelos de infecção aguda (cepa Y e Colombiana) foram utilizados (Batista *et al.* 2010a). Contudo, quando esta molécula foi sintetizada utilizando outro sal (e denominada DB1955) visando aumentar sua solubilidade observamos uma queda na eficácia sendo somente capaz de reduzir a carga parasitária em cerca de 46%. Esta menor potencia *in vivo* teve relação direta com menor acúmulo da DB1955 no coração (Zhu *et al.* 2012). Um derivado da DB766, a DB1831 também exibiu excelente atividade *in vitro* na faixa de nanomolar. Para melhorar a solubilidade para condução dos ensaios *in vivo*, esta *bis*-AIA foi sintetizada usando um sal de ácido metanosulfônico e então, denominada DB1965. A administração de DB1965 a partir da positivação da parasitemia dos animais infectados com cepa Y resultou em importante redução de carga parasitaria (>93%) quando 12.5 mg/kg foi dada durante 5 dias via i.p. (Da Silva *et al.* 2012). Infelizmente, não observamos cura parasitológica e períodos de administração da DB1965 superiores a 10 dias desencadearam efeitos colaterais indesejáveis (da Silva *et al.* 2012). Muitas *bis*-AIAs também exibem atividade tripanocida promissora para potencial uso em bancos de sangue, outra atual demanda para área de elevada endemicidade. Quando incubadas com formas sanguíneas em presença de 96% de sangue de camundongo a 4°C observa-se excelente potencia destas moléculas aromáticas com ação na faixa micromolar, que representa protocolo para identificação de alternativas profiláticas para uso em bancos de sangue (Batista *et al.* 2010a, 2011, da Silva *et al.* 2011 a e b, 2012).

O mecanismo de ação das amidinas aromáticas não é completamente elucidado. Sabe-se que parte da ação das diamidinas aromáticas clássicas como a Pt esteja associado a sua ligação de modo não intercalante e não covalente ao sulco menor do DNA em sequencias ricas em bases AT (Goodsell *et al.* 1986), resultando em dano funcional desta molécula. O kDNA do parasito possui regiões mais ricas em Adenina-Timina no sulco menor, favorecendo a seletividade das amidinas que tem sido desenhadas e sintetizadas para este fim (Tidwell & Boykin 2003, Wilson *et al.* 2008). Estudos através de técnicas de microscopia de fluorescência e por

microscopia eletrônica revelaram que compartimentos ricos em DNA como o núcleo e em especial o cinetoplasto do parasito revelam-se muito alterados frente a incubação de *T. cruzi* com estas moléculas demonstrando que estas estruturas possam ser alvos (primários ou secundários) de diamidinas clássicas (Silva et al. 2008, Batista *et al.* 2010a,b, Soeiro *et al.* 2010 e 2013). Entretanto, estudos termodinâmicos têm sugerido que embora algumas AIAs muito potentes sobre *T. cruzi* não são fortes ligantes de DNA embora sejam capazes de alterar gravemente a topologia do kDNA purificado do parasito (Daliry *et al.* 2011). Algumas amidinas também foram localizadas em organelas citoplasmáticas desprovidas de DNA, como acidocalcissomas, que podem representar possíveis locais de estoque dos compostos ou mesmo alvos celulares em *T. cruzi* e *T. brucei* (Soeiro *et al.* 2010, 2013). Outros mecanismos têm sido relatados incluindo inibição de síntese de poliaminas, inibição de topoisomerasas, e mesmo da biossíntese de esteróis (Soeiro *et al.* 2013, 2014).

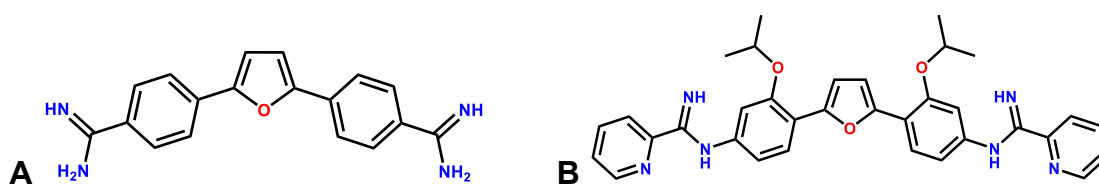


Figura 4. Exemplos das duas classes de amidinas aromáticas: diamidina aromática furamidina (DB75) e arilimidamida (DB766). Fonte: Soeiro *et al.* 2013, Fig.1 p 931.

1.7 Justificativa

Há mais de 40 anos de introdução no uso clínico, nifurtimox e benzonidazol representam os únicos medicamentos disponíveis para o tratamento da DC. Ambos exibem sérias limitações tais como (a) baixa eficácia durante a fase crônica tardia, (b) longos períodos de tratamento (até 60 dias) além de, (c) efeitos colaterais, em especial alterações cutâneas e neurológicas (polineurites) que muitas vezes resultam no abandono do tratamento, e (d) ocorrência de cepas naturalmente resistentes a nitroderivados (Romanha *et al.* 2010). Portanto, há uma necessidade urgente na busca de alternativas para o tratamento desta silenciosa e negligenciada parasitose que representa o objeto de estudo da presente dissertação.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar por análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo* a atividade biológica de novas arilimidamidas (2EVK008, 27SMB078, 28SMB032, 31DAP069, 36DAP015) sobre o curso da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, explorando propriedades farmacológicas e alvos celulares por abordagens computacionais e ultraestruturais.

2.2 Objetivos Específicos

a) Realizar predição *in silico* de propriedades farmacológicas e de toxicidade dos compostos, além de filtragem de PAINS (Pan-assay Interference Compounds), objetivando exclusão de elementos promíscuos e pouco seletivos;

b) Determinar o perfil de toxicidade *in vitro* dos compostos sobre células de mamíferos (L929 e cultivo primário de células cardíacas);

c) Avaliar a atividade tripanocida *in vitro* e determinar o índice de seletividade (IS) dos compostos sobre formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares (ensaios de infecção) de diferentes cepas de *T. cruzi* (DTU VI Tulahuen e DTU II cepa Y), comparando com a ação do fármaco de referência, o benzonidazol;

d) Investigar a eficácia *in vivo* dos compostos selecionados a partir dos estudos *in silico* e *in vitro*, utilizando camundongos no curso da infecção aguda por *Trypanosoma cruzi* de modo a explorar potencial de eficácia em modelos experimentais;

e) Identificar potenciais alvos moleculares e danos celulares induzidos pelos compostos ativos sobre *T. cruzi* por análises *in silico* e ultraestruturais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Compostos

Os compostos estudados foram sintetizados e cedidos pelo grupo do Dr Richard Tidwell da Universidade da Carolina do Norte. Soluções estoque das AIAs 2EVK008, 27SMB078, 28SMB032, 31DAP069, 36DAP015 (tabela 4) foram preparadas em dimetil sulfóxido (DMSO), com a concentração final nunca excedendo 0,6% para experimentos *in vitro*, evitando toxicidade para as células (da Silva *et al.* 2008). Para estudos *in vivo*, realizamos a solubilização da AIA em DMSO e em seguida, diluição em água de vacina estéril de modo a administrar via intraperitoneal (i.p.) a concentração final em 0.1mL, nunca excedendo 10% de DMSO. Benzonidazol (fármaco de referência) foi preparado em água de vacina estéril com 3% de Tween 80 (Sigma-Aldrich).

3.1 Estudos *in silico*

3.1.1 Cálculo de propriedades ADMET e análise de PAINS

Inicialmente, gerou-se o SMILES para cada molécula usando o editor químico gratuito Marvin Sketch (ChemAxion), uma especificação necessária para obter propriedades farmacocinéticas de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) em servidores *web* (redes). Algumas propriedades ADMET foram calculadas utilizando quatro serviços de diferentes redes. O servidor admetSAR (Cheng *et al.* 2003), para prever carcinogenicidade (Lagunin *et al.* 2009), mutagenicidade- AMES (Hansen *et al.* 2009), absorção intestinal humana (shenet *et al.* 2010) e inibição de cinco citocromos da família P450 (Chenget *et al.* 2011). O servidor ACD / I-Lab (<https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>) foi utilizado para prever a genotoxicidade e o volume de distribuição. O potencial para a inibição de hERG foi predito usando o servidor Pred-hERG (<https://labmol.farmacia.ufg.br/predherg/>) (Braga *et al.* 2014 e 2015) e a toxicidade oral de roedores, pelo servidor PROTOX (<http://tox.charite.de/tox/>) (Drwal *et al.* 2014). A análise dos compostos de interferência pan-assay (PAINS) (Baell *et al.* 2010 e 2014) foi realizada utilizando o

servidor removedor de falsos positivos (<http://cbligand.org/PAINS/>) (Baell *et al.* 2010).

3.1.2 Predição de alvo molecular

3.1.2.1 Modelagem por homologia

A abordagem de modelagem por homologia foi utilizada para gerar as estruturas tridimensionais de candidatos-alvo de *T. cruzi*. As sequências de aminoácidos dos alvos foram extraídas da base de dados UniProt (Apweiler *et al.* 2004) e os modelos 3D gerados utilizando o servidor SWISS-MODEL (Biasini *et al.* 2014). Neste servidor, realizou-se o alinhamento de sequência alvo-modelo após pesquisa de moldes de raios X das proteínas putativas em PDB (Protein Data Bank) a fim de gerar os modelos 3D para todas as sequências-alvo. Além disso, os modelos construídos foram exportados para o servidor SAVES (<http://services.mbi.ucla.edu/SAVES/>) e sua qualidade estereoquímica global, incluindo ângulos de torção da estrutura através do gráfico de Ramachandran, verificada de acordo com a análise PROCHECK (Laskowski *et al.* 1993).

3.1.2.2 Preparação das estruturas 3D dos ligantes

As estruturas 3D de amidinas aromáticas foram importadas para o *workspace* Maestro v.9.3 (Schrödinger, LCC, New York, 2012) e preparadas utilizando LigPrep v.2.5 (Schrödinger, LCC, New York, 2012). Todos os estados de ionização e tautomeria possíveis foram gerados a pH 7,0 +/- 1,0 usando Epik v.2.3 (Shelley *et al.* 2007). Os conformeros e tautômeros de energia potencial mais baixos foram utilizados para estudos de docagem.

3.1.2.3 Docagem molecular

As estruturas 3D dos candidatos-alvo de *T. cruzi* foram importadas para a área de trabalho Maestro e preparadas utilizando o fluxograma da ferramenta Protein Preparation Wizard: átomos de hidrogênio foram adicionados de acordo com o cálculo de Epik v.2.3 (Shelley *et al.* 2007) para valores de pKa +/- 1,0) e minimizados usando o campo de força OPLS-2005 (Banks *et al.* 2005). Em seguida, foram criadas *grid boxes* (grades) com comprimentos variando entre raios de 17-24 Å em torno dos locais de ligação, utilizando o módulo de geração de *grids* de receptor do Glide v.5.8 (Friesner *et al.* 2004). Os detalhes de cada *grid* são mostrados na Tabela 1 suplementar. Em seguida, simulações de docagem foram realizadas usando Glide v.5.8 (Friesner *et al.* 2004) com resolução "SP". Finalmente, as orientações de ligação das moléculas aromáticas no sítio ativo dos alvos foram analisadas e as conformações energeticamente favoráveis foram selecionadas pela função de GlideScore (Eldridge *et al.* 1997).

3.2 Estudos *in vitro*

3.2.1 Células de Mamífero e teste de citotoxicidade

Culturas primárias de células cardíacas embrionárias (CC) foram obtidas de camundongos suíços (18 dias de gestação) seguindo método previamente descrito (Meirelles *et al.* 1986). Após a purificação, as CC foram semeadas em placas de 24 e 96 poços contendo lâminas revestidas com gelatina a densidades de 2×10^5 e 5×10^4 células / poço, respectivamente (Timm *et al.* 2014). As culturas CC foram então mantidas em meio Eagle modificado Dulbecco (DMEM sem vermelho de fenol, Sigma-Aldrich) suplementado com 2% de extrato de embrião de pinto, soro fetal bovino a 5% (SFB), soro de cavalo a 10%, L-glutamina 1 mM e CaCl_2 2,5 mM a 37 °C. Adicionalmente, foram cultivados fibroblastos L929 de camundongo (4×10^3 células / poço) em placas de 96 poços a 37 °C em meio RPMI 1640 (pH 7,2 a 7,4) sem vermelho de fenol (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal e 2 mM de glutamina (RPMI), conforme relatado (Romanha *et al.* 2010, Fivelman *et al.* 2004). CCs e culturas de células L929 foram incubadas a 37 °C durante diferentes períodos (24-96 h), com concentrações crescentes de cada composto (até 720 µM)

diluído em DMEM sem vermelho fenol. Em seguida, a morfologia das células de mamíferos e a contratilidade espontânea (dos CC) foram avaliadas por microscopia óptica, e a viabilidade celular determinada por ensaio colorimétrico utilizando prestoBlue- (CC) e Alamar blue (L929) (Batista *et al.* 2010a, Romanha *et al.* 2010). Após incubação, a absorvância foi medida a 570 e 600 nm por espectrofotômetro e os resultados calculados de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, calculou-se a concentração que reduziu a viabilidade celular em 50% (LC₅₀) através de análise de regressão não linear por *graphpad prism v.6*, assim como as estatísticas: erro padrão da media (SEM) e intervalo de confiança (IC) de 95%.

3.2.2 Obtenção de parasitos

Camundongos suíços machos (18-20 g) foram injetados via intraperitoneal com *T. cruzi* cepa Y TcII (5×10^5 parasitos/0,1 ml). No pico da parasitemia (7dpi), as formas tripomastigotas sanguíneas (TS) foram obtidas por punção cardíaca e os parasitos purificados por centrifugação diferencial. O total de parasitos/ml foi determinado por câmara de Neubauer.

T. cruzi da cepa Tulahuen (TcVI), que expressa o gene da β -galactosidase, foi mantido em cultura de L929. No 4 dpi, os tripomastigotas liberados no sobrenadante das culturas infectadas foram recolhidos, sedimentados e suspensos em meio RPMI 1640 (pH 7,2 a 7,4) sem vermelho de fenol (Gibco BRL) suplementado com 10% de soro bovino fetal. Em seguida, o nº total de parasitos/ml determinado por quantificação em câmara de Neubauer.

3.2.3 Ensaios de atividade tripanocida

Tripomastigotas sanguíneos ($5,0 \times 10^6$ parasitos/ml), foram incubados durante 24 horas a 37 °C em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com SFB 5%, na presença ou ausência de dos compostos sintéticos (2EVK008, 27SMB078, 28SMB032, 31DAP069, 36DAP015) m diferentes concentrações (0 a 32 μ M), como já descrito (Batista *et al.* 2010a). Após 2 e 24 h de incubação com composto, a porcentagem de morte parasitária foi determinada por microscopia óptica utilizando câmara de Neubauer, que permite a quantificação direta de parasitos vivos. Em seguida, determinou-se a concentração que reduziu o número de parasitos em 50%

(EC₅₀) utilizando o *graphpad prism v.6* para análise, assim como as estatísticas (SEM-95% CI).

O efeito da AIA sobre amastigotas intracelulares foi avaliado em células L929 previamente infectadas com *T. cruzi* (β -galactosidase) na proporção de 10:1 parasito-célula hospedeira. Após infecção por 2h, as culturas de L929 foram lavadas com meio de cultura e após 48 h, os compostos foram adicionados por 96 h, conforme estabelecido (Romanha *et al.* 2010). Alternativamente, as CC foram infectadas com TS (cepa Y) utilizando a mesma proporção de 10:1 parasito-célula hospedeira. Após 24 h de interação, as culturas infectadas foram lavadas e expostas às AIAs durante 48 h a 37 ° C em concentrações não tóxicas previamente estabelecidas nas células hospedeiras. Em seguida, as amostras foram fixadas com solução de Bouin (5 min) e coradas com solução de Giemsa. O total de 400 células por lamínula foi contado por microscopia óptica, determinando o percentual de células infectadas e número de parasitos por células conforme descrito (Batista *et al.* 2010a). Somente os parasitos que possuíam núcleo e cinetoplasto característicos foram contados, uma vez que estruturas irregulares poderiam significar parasitos em processo de morte. A atividade dos compostos foi estimada calculando o índice de infecção (II - percentagem de células infectadas multiplicada pela média do número de parasitos intracelulares por célula hospedeira infectada). Em seguida, o EC₅₀ também foi determinado como relatado acima pela análise por *graphpad prism v.6*.

O índices de seletividade (IS) foram obtidos pela razão EC₅₀/LC₅₀.

3.2.4 Avaliação da terapia combinada

As interações de compostos *in vitro* foram avaliadas utilizando um método de proporção fixa (Fivelman *et al.* 2004) combinando o composto mais promissor 28SMB032 (maior seletividade contra as formas intracelulares e TS) e Bz. As concentrações máximas de fármacos individuais foram determinadas, de modo a assegurar que o EC₅₀ de cada composto fosse próximo da quarta diluição em uma série de sete, em uma diluição seriada de 1:3 (Trinconi *et al.* 2016). Por conseguinte, as concentrações superiores foram preparadas em proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 de 28SMB032 e Bz, respectivamente, seguidas por diluições em série até o sétimo poço da placa de 96 poços (Fivelman *et al.* 2004, Trinconi *et al.* 2016). Para

cada razão, foi calculado EC₅₀ relativo a cada composto, separadamente. Para cada combinação, foram utilizados 2 experimentos independentes em triplicata.

3.2.5 Determinação do índice de concentração inibitória fracional (FICI)

O índice de concentração inibitória fracional (FICI) no EC₅₀ de cada composto foi calculado pela razão do EC₅₀ quando em combinação / EC₅₀ do composto (5:0). O somatório de FICI (Σ FICI) para cada proporção foi obtido através de FICI (28SMB 032) + FICI (Bz) (Trinconi *et al.* 2016). A média dos Σ FICIs ($x\Sigma$ FICI) foi calculada. O $x\Sigma$ FICI foi utilizado para classificar a natureza da interação, conforme recomendado por Odds (Odds 2003): sinergia para $x\Sigma$ FICI \leq 0,5, nenhuma interação para $x\Sigma$ FICI entre 0,5-4 e antagonismo para $x\Sigma$ FICI $>$ 4.

Todos os ensaios *in vitro* foram realizados pelo menos duas vezes em triplicata.

3.2.6 Análise estrutural

Tripomastigotas sanguíneos (5×10^6 parasitos/ml) foram incubadas por 2 h a 37 °C em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com SFB 5%, na presença ou ausência das AIAs 31DAP069, 36DAP015 e 28SMB032 utilizando o valor correspondente de EC₅₀ previamente determinado no tempo de 24 h.

Os parasitos foram lavados em solução tampão utilizando solução tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2, e fixados por 1 h a 4 °C com 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato, pH 7,2. Após lavagem, os parasitos foram pós-fixados por 30 min a temperatura ambiente com 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄) em tampão cacodilato, pH 7,2, acrescido de 0,8% de ferricianeto de potássio. Para microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram desidratadas utilizando uma série etanólica crescente (30,50,70, 90 e duas vezes 100% - 10 min cada), secas pelo método do ponto crítico com CO₂, montadas com fita dupla-face sobre suportes de alumínio e revestidas com uma camada de ouro de 20 nm (Salomão *et al.* 2010). As amostras foram examinadas utilizando um microscópio JEOL-JSM-6390-LV.

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), as amostras foram desidratadas utilizando uma série crescente de acetona (30, 50, 70, 90 e duas vezes 100% - 10 min cada). Após infiltração com mistura de resina polimérica 1: 2 e 100%

de acetona durante 12 h, as amostras foram finalmente incluídas em resina *polyBed* pura, seções ultrafinas obtidas, contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas com microscópio eletrônico Jeol JEM-1011 (Salomão *et al.* 2010).

3.3 Análise *in vivo*

3.3.1 Modelo de infecção

Camundongos Swiss Webster (18-20 g) machos obtidos a partir das instalações do Instituto de Ciencia e Tecnologia de Biomodelos (ICTB)/Fiocruz foram alojados no máximo de 6 animais por caixa, mantidos estantes ventiladas a 20-24 °C em ciclo claro/escuro de 12h/12h, com água esterilizada e ração *ad libitum*. Os animais foram aclimatados durante 7 dias antes de iniciar os experimentos. A infecção de 10⁴ TS (cepa Y) foi realizada i.p. Os camundongos não infectados foram mantidos em condições idênticas (Batista *et al.* 2010a).

3.3.2 Esquemas de tratamento, parasitemia e taxas de mortalidade

Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n = 6): não infectados (não infectados e não tratados), não tratados (infectados, porém tratados apenas com veículo) e tratados (infectados e tratados com os compostos). Os camundongos infectados com *T. cruzi* (cepa Y) foram tratados no 5^o e 8^o dias pós-infecção (dpi), que neste modelo experimental correspondem aos tempos de positividade da parasitemia e pico, respectivamente, utilizando monoterapia e esquemas combinados descritos a seguir: 1 e 10 mg/kg/dia de 28SMB032 intraperitoneal (i.p.) (Grupos 3 e 4), 10 e 100 mg/kg/dia de Bz administrados por via oral (v.o.) (grupos 5 e 6) e 1 mg/kg/dia de 28SMB032 i.p. + Bz 10 mg/kg/dia p.o. Apenas os camundongos com parasitemia positiva foram utilizados nos grupos infectados. Esta foi individualmente verificada por contagem microscópica direta do número de parasitos em 5 µl de sangue, e os camundongos verificados quanto à mortalidade diária. A mortalidade é expressa como a percentagem de mortalidade acumulativa (Batista *et al.* 2010a).

Este estudo (LW-16/14) foi aprovado pela Comissão de ética no Uso de Animais (CEUA) / FIOCRUZ, seguindo os princípios éticos de cuidado com animal conforme princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL).

4. RESULTADOS

4.1 Propriedades ADMET e filtragem de PAINS *in silico*

A análise ADMET foi realizada para explorar algumas das propriedades das amidinas que constam na tabela 3. Analisando os achados, todos os compostos foram preditos como não carcinogênicos, não genotóxicos e não indutores de bloqueio em hERG. Além disso, a maioria deles também foi predita como não inibidora de isoformas do citocromo P450 presentes neste estudo, e com toxicidade oral aceitável para os roedores, sendo moderada a predição de absorção intestinal humana além de exibir razoáveis volumes de distribuição. Por outro lado, com exceção de 2EVK008, a maioria foi predita como mutagênica. Além disso, nenhum dos compostos analisados foi classificado como PAINS e, conseqüentemente, exibindo pouca probabilidade de que suas atividades biológicas sejam inespecíficas.

Tabela 3. Propriedades ADMET previstas *in silico* para os compostos estudados.

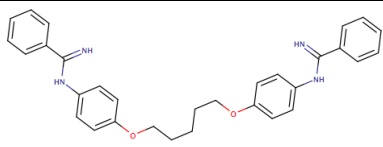
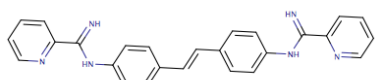
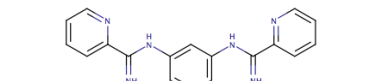
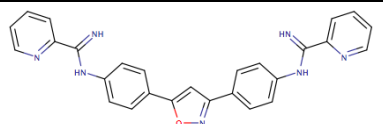
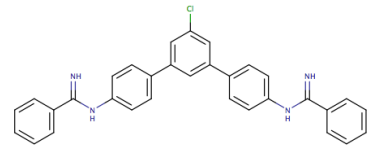
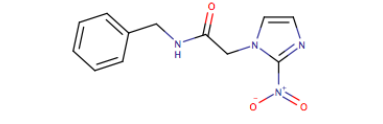
Propriedades	Compostos				
	2EVK008	27SMB078	28SMB032	31DAP069	36DAP015
Absorção intestinal humana^a	>30%	>30%	>30%	>30%	>30%
Volume de distribuição^b	6.97 L/kg	4.09 L/kg	2.48 L/kg	2.84 L/kg	8.66 L/kg
Inibição de CYP3A4^a	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Inibição de CYP2D6^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Inibição de CYP2C19^a	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
Inibição de CYP2C9^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Inibição de CYP1A2^a	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
Toxicidade oral aguda^c	500 mg/Kg	195 mg/Kg	195 mg/Kg	1012 mg/Kg	375 mg/Kg
Mutagenicidade AMES^a	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
Carcinogenicidade^a	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Genotoxicidade^b	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Bloqueio de hERG^d	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Predições baseadas em: ^aadmetSAR (Cheng *et al.* 2012), ^bACD/I-Lab (<https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>), ^cPROTOX (Drwalet *et al.* 2014), and ^dPred-hERG (Braga *et al.* 2015).

4.2 Triagem fenotípica *in vitro*

A primeira avaliação *in vitro* relativa à atividade tripanocida contra as formas sanguíneas (da cepa Y classificada como DTU II) exibiu os resultados observados na tabela 4. Estes resultados mostram que 4 dos 5 compostos testados foram mais ativos que Bz (EC₅₀ 9.76 µM) após 24 h de exposição. 28SMB032 foi tão potente quanto o Bz (EC₅₀ 10.48 µM). Os compostos 2EVK008, 31DAP069 e 36DAP015 também tiveram um rápido perfil de ação (“fast killers”), com EC₅₀ inferior a 10 µM após 2 h de incubação, sendo que as duas últimas foram as mais potentes (EC₅₀ de 1.81 e 1.79 µM, respectivamente). Considerando o perfil de toxicidade em relação às células hospedeiras de mamífero, infelizmente 27SMB078 precipitou a 0.5 µM e não pode ser estudado em concentrações superiores. 31DAP069 e 36DAP015 apresentaram toxicidade considerável (LC₅₀ variando entre 9 e 12 µM) enquanto que 28SMB032 foi o menos tóxico com índice de seletividade (IS) de 54.

Tabela 4. Atividade tripanocida das AIAs contras as formas tripomastigotas sanguíneas (cepa Y) e intracelulares (Tulahuen β -gal) de *Trypanosoma cruzi*, citotoxicidade em relação a L929 e seus correspondentes índices de seletividade (IS).

Composto	Formas sanguíneas cepa Y ^a			Formas intracelulares cepa Tulahuen β -gal ^b		Toxicidade L929 ^c	
	EC ₅₀ (μ M) ^d		IS 24 h	EC ₅₀ (μ M) ^d		LC ₅₀ (μ M) ^d	
	2 h	24 h		96 h	96 h	24 h	96 h
 2EVK 008	4.83 (3.36 - 6.95)	1.21 (0.87-1.68)	20	2.04 (1.45 - 2.86)	7	24.75 (12.62 - 48.51)	14.33 (5.98 - 34.31)
 27SMB 078	30.67 (24.07 - 39.08)	0.46 (0.27 - 0.77)	--	7.78 (6.31 - 9.59)	--	ND ^e	ND ^e
 28SMB 032	44.61 (32.18 - 61.83)	10.48 (6.55 -16.73)	54	0.54 (0.41 - 0.70)	285	570.6 (364.0 - 894.7)	153.7 (98.42-240.1)
 31DAP 069	1.81 (1.45 - 2.24)	0.88 (0.65 - 1.19)	4	1.94 (1.36 - 2.76)	7	12.61 (6.58 - 24.15)	12.91 (5.26 - 31.71)
 36DAP 015	1.79 (1.40 - 2.30)	0.347 (0.26 - 0.45)	6	1.06 (0.625 - 1.81)	6	8.96 (4.41 - 18.20)	6.80 (2.95 - 15.68)
 Bz	> 50	9.76 (6.97-13.67)	37	4.06 (3.61 - 4.56)	89	>360	>360

^aAtividade *In vitro* dos compostos contra formas sanguíneas foram determinadas por microscopia óptica. Os índices de seletividade (IS) 24 h foram calculados pela razão LC₅₀/EC₅₀ (24 h).^bAtividades *in vitro* dos compostos contra as formas intracelulares foram determinadas em L929 infectada por ensaio colorimétrico (Alamarblue). Os índices de seletividade (IS) 96 h foram calculados por LC₅₀/EC₅₀ em 96 h.^cO perfil de toxicidade L929 foi determinado por ensaio colorimétrico (Alamarblue).^d Erro padrão da média (SEM) ^eND: Não determinado devido à precipitação do composto. N° de ensaios=3.

Em relação à atividade tripanocida contra as formas intracelulares da DTU VI (cepa Tulahuen), 4 compostos (2EVK008, 28SMB032, 36DAP015, 31DAP069) apresentaram valores de EC₅₀ inferiores ao Bz (4.06 µM), variando de 0.54-2.04 µM (tabela 4). A molécula 28SMB032 também apresentou o IS mais elevado, sendo 285 vezes mais seletiva contra parasitos intracelulares em relação às células de mamíferos (tabela 4). Portanto, este composto foi selecionado para o próximo passo referente à infecção de células cardíacas pela cepa Y. Os dados confirmaram a potência de 28SMB032 contra as formas intracelulares, sendo cerca de 200 vezes mais seletivas e com EC₅₀ (1.59 µM) semelhante ao Bz (1.58 µM) (tabela 5), com perfil de redução do número de parasitos como também do percentual de células infectadas (Figura 5).

Tabela 5. Atividade *in vitro* (EC₅₀) e índice de seletividade (IS) dos compostos testados contra as formas intracelulares de *T. cruzi*.

Composto	<i>T. cruzi</i> cepa Y ^a	CC ^b	IS ^c
	^d EC ₅₀ (µM) 48 h	^d LC ₅₀ (µM) 48 h	
28SMB032	1.59 (1.21 -2.09)	304.4 (240.4-385.5)	191.44
Bz	1.58 (1.03-2.43)	>1000	633

^aCélulas cardíacas foram infectadas com cepa Y de *T. cruzi*, a atividade foi analisada por coloração com Giemsa e microscopia óptica. ^bO perfil de toxicidade das células cardíacas foi determinado por ensaio colorimétrico (Prestoblue). Os índices de seletividade (IS) foram calculados por LC₅₀/EC₅₀(48 h). ^dErro padrão da média (SEM): 95%CI.

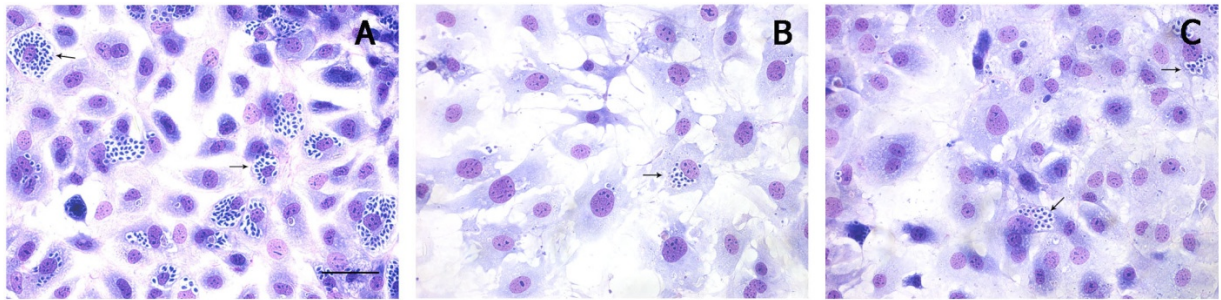


Figura 5. Atividade *in vitro* de 28SMB032 (B) e Bz (C) a 1,25 μM contra formas intracelulares de *T. cruzi* (cepa Y) em comparação com os parasitos não tratados (A). As setas pretas apontam formas amastigotas dentro da célula cardíaca. Observa-se uma diminuição no número de células infectadas e de parasito por célula para ambos os compostos. Barra=50 μm .

4.3 Terapia combinada *in vitro*

Em seguida, o efeito terapêutico do 28SMB032 combinado com Bz, fármaco de referência, foi explorado sobre a infecção *in vitro* de células L929 com a cepa Tulahuen. Nossos dados mostram que o valor do $\chi\Sigma\text{FICI}$ foi de 0,95 como apresentado na tabela 6, sendo portanto indicativo de ausência de interação.

Tabela 6. EC_{50} e FICI da combinação de 28SMB032/Bz contra as formas intracelulares de Tulahuen β -galactosidase. As concentrações (μM) mais altas das diluições seriadas [Topo] em três vezes também estão representadas paralelamente às razões dos compostos 28SMB032:Bz.

28SMB032:Bz ^a		EC_{50}^b (μM)		FICI		ΣFICI	$\chi\Sigma\text{FICI}$
		28SMB032	Bz	28SMB032	Bz		
Razões	[Topo](μM)						
5:0	14.58 : 0	0.17(0.14-0.21)					
4:1	11.66 : 21.92	0.18(0.15-0.21)	0.07(0.06-0.08)	1.08	0.02	1.10	0.95
3:2	8.75 : 42.85	0.19(0.16-0.23)	0.20 (0.17-0.24)	1.13	0.05	1.18	
2:3	5.83 : 65.77	0.12(0.09-0.18)	0.30 (0.21-0.43)	0.74	0.07	0.81	
1:4	2.92 : 87.70	0.10(0.08-0.14)	0.64 (0.47-0.89)	0.62	0.15	0.77	
0:5	0 : 109.62		4.36 (3.12-6.10)				

^aAtividade da combinação de 28SMB32 e Bz *in vitro* contra as formas intracelulares em L929 culturas infectadas com cepa Tulahuen β -gal foi determinado por ensaio colorimétrico (Alamarblue), o tempo de incubação com os compostos foi de 96 h. ^bSEM:95%CI.

4.4 Eficácia *in vivo*

Devido ao elevado IS contra as duas DTUs testadas (cepa Y e Tulahuen) e sobre as distintas formas parasitárias (formas sanguíneas e intracelulares), 28SMB032 foi escolhido para o ensaio *in vivo* utilizando modelo murino de infecção aguda (cepa Y). Entretanto, o composto 28SMB032 administrado via i.p. de 1 e 10 mg/kg/dia exibiu um perfil muito tóxico para ambas as doses, resultando em > 83% de morte com menos de 24 horas após administração no primeiro dia de tratamento. A necropsia macroscópica mostrou uma alta quantidade de depósitos amarelos do 28SMB032 no peritônio dos camundongos, além de hemorragia gastrointestinal, sinais de insuficiência renal aguda com atrofia renal, confirmando sua elevada toxicidade *in vivo*.

4.5 Predição de alvo molecular *in silico*

4.5.1 Geração do *pool* de alvos de *T. cruzi*

Para análise *in silico*, foi gerado um “pool” de alvos potenciais em *T. cruzi* em duas etapas. Primeiro, foram selecionadas todas as estruturas 3D de alvos de *T. cruzi* disponíveis no Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>) com ligante co-cristalizado. Para completar o pool de metas para o *screening* virtual inverso, utilizou-se uma segunda abordagem baseada no que já está descrito na literatura, aplicando uma pesquisa bibliográfica para alguns dos principais alvos-chave do parasito que possuíam substratos e / ou inibidores com características bioisósteras semelhantes às das amidinas estudadas, ex.átomos de nitrogênio protonados nos grupos amidina (Figura 6).

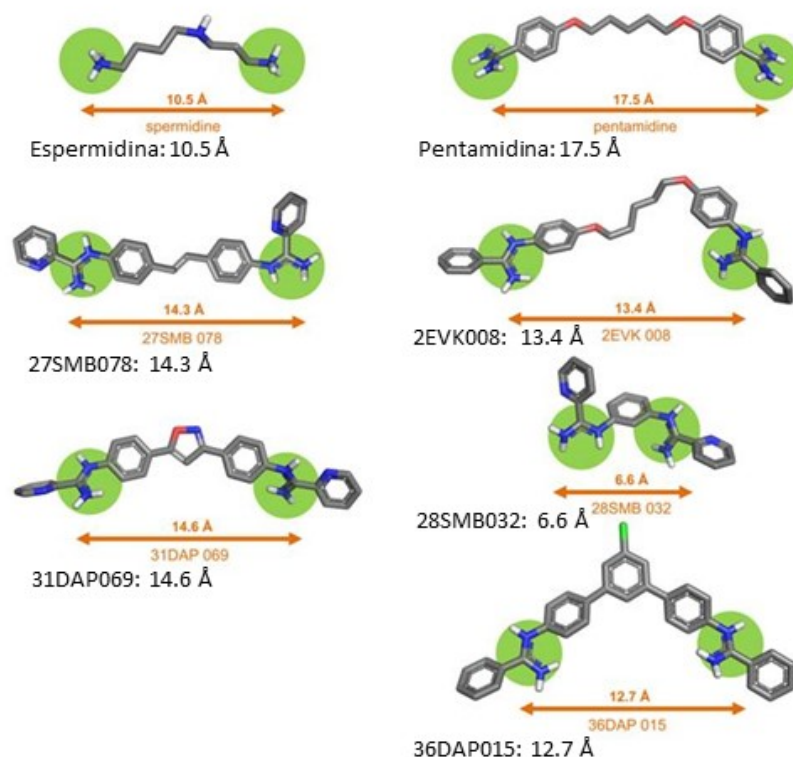


Figura 6. Distância em ângström (Å) dos átomos de nitrogênio protonados entre os grupos imino terminais (esferas verdes), indicando conservação das características bioisostéricas entre a espermidina, a pentamidina e as diamidinas aromáticas em questão.

A partir da Figura 6, podemos observar que todos os compostos estudados mostram uma distância similar entre os átomos de nitrogênio protonados dos grupos imino terminais em comparação com os controles utilizados (espermidina e pentamidina). Com base no conceito de que "ligantes semelhantes se ligam a alvos semelhantes", selecionamos três alvos chave envolvidos no metabolismo da putrescina ou de espermidina: espermidina sintase, tripanotona sintetase e tripanotona redutase (Maya *et al.* 2014) e quatro alvos conhecidos da pentamidina e seus análogos: POT1.1, POT1.2 (Díaz *et al.* 2014), aquaporina (Munday *et al.* 2014, Song *et al.* 2016) e ácido desoxirribonucleico (DNA) (Moreno *et al.* 2010, Nunn *et al.* 1993).

As estruturas 3D da tripanotona sintetase, POT1.1, POT1.2 e aquaporina não estavam disponíveis no PDB. Conseqüentemente, os modelos de homologia foram construídos comparando as sequências alvo com sequências semelhantes de outras proteínas ("templates") para as quais estão disponíveis estruturas 3D. Após a modelagem de homologia, realizou-se uma validação estatística de cada modelo construído utilizando o programa PROCHECK para explorar a qualidade

estereoquímica dos ângulos diedros phi contra “psi” de resíduos de aminoácidos e para identificar regiões estericamente permitidas para estes ângulos. Os resultados desta análise são apresentados na Tabela 7 e nas Figuras S1 e S2 (Informação suplementar).

Tabela 7. Resumo dos resultados estatísticos do modelo de homologia das proteínas de *T. cruzi*.

Alvo (UniProt ID)	Informação do template			Análise PROCHECK			
	Cobertura	Identidade sequencia	template	Regiões mais favorecidas	Regiões permitidas adicionais	Regiões “generosamente” permitidas	Regiões não permitidas
Aquaporina (Q8MXA3)	87%	38%	2NE2	84.7%	10.6%	1.8%	2.9%
Tripanotiona sintetase (Q9GT49)	97%	60%	2VOB	92.7%	6.2%	0.7%	0.4%
POT1.1 (B2CQQ7)	64%	27%	3OB6	83.4%	12.2%	2.2%	2.2%
POT1.2 (Q4D143)	63%	26%	3L1L	86.1%	9.7%	3.3%	0.8%

A partir da Tabela 7 podemos ver que 83,4-92,7% dos resíduos das proteínas modeladas estão dentro das regiões mais favorecidas (vermelho na Fig. S1), 6,2 - 12,2% dentro das regiões adicionais permitidas (amarelo na Fig. S1), 0,7 - 3,3% dentro das regiões generosamente permitidas (bege na Figura S1), e apenas 0,4 - 2,9% dentro das regiões não permitidas (brancas na Figura S1). Os resíduos localizados nas regiões não autorizadas estão muito longe dos locais de ligação, indicando que estes resíduos não podem afetar as simulações de ligação ligante-proteína. Portanto, as propriedades estereoquímicas gerais dos modelos gerados foram altamente confiáveis, e os modelos revelaram-se úteis para o estudo prospectivo de *target fishing*.

O *pool* de alvos finais está resumido na Tabela 1 suplementar e consistiu em 30 alvos potenciais de *T. cruzi* e 23 entradas de PDB. Este grupo-alvo apresenta um conjunto abrangente de enzimas e proteínas reguladoras, que poderiam estar envolvidas nos efeitos tripanocidas das moléculas estudadas. Como tal, foi considerado um bom conjunto de metas para o *target fishing*.

4.5.2 Target fishing

Estudos de docagem molecular foram utilizados para elucidar qual proteína do conjunto de alvos de *T. cruzi* poderia interagir com as amidinas. Os resultados desta análise baseiam-se no *ranking* de poses ordenado por valores de docagem (que se correlaciona com energia livre de ligação) e análise visual (mostrando se compostos ativos podem interagir com o sítio ativo do alvo). Como podemos ver na Tabela 8, as energias de docagem do GlideScore indicam que as moléculas aromáticas estudadas têm alta afinidade com o ácido desoxirribonucleico (DNA), com energias entre -12,08 e -9,62 kcal/mol, estando na mesma faixa de afinidade de pentamidina (-11,17 kcal/mol), um conhecido ligante de DNA. Os compostos estudados mostraram também energias consideráveis, mas menos pronunciadas de GlideScore com farnesiltransferase (entre -9,73 e -7,41 kcal/mol), espermidina sintase (entre -9,50 e -6,39 kcal/mol), estero1 14-alfa demetilase, 9,76 e -7,25 kcal/mol) e UDP-galactopiranosose mutase (entre -10,10 e -4,38 kcal/mol).

Tabela 8. Resultados dos valores de docagem (kcal/mol) de amidinas com alvos de *T. cruzi*.

Candidatos à alvo	Ligantes				
	2EVK008	27SMB078	28SMB032	31DAP069	36DAP015
	EC ₅₀ (µM) em TS cepa Y (24h/37C)				
	1.21	0.46	10.48	0.88	0.35
Ácido desoxirrobuncleico	-11.21	-10.14	-9.62	-11.45	-12.80
UDP-Galactopirranose mutase	-8.27	-8.90	-4.38	-10.10	-7.15
Esterol 14-alfa demetilase	-9.76	-8.21	-7.25	-9.16	-8.74
Farnesiltransferase	-9.73	-7.66	-9.35	-8.51	-8.39
Espermidina sintase	-8.83	-9.48	-9.50	-8.11	-6.39
Pteridina redutase 2	-7.45	-7.49	-5.98	-7.69	-7.08
Tripanotiona redutase	-6.91	-6.77	-5.51	-7.09	-8.21
Cruzaína	-6.12	-6.22	-5.16	-6.95	-6.58
Fosfodiesterase	-7.06	-6.38	-5.29	-6.78	-7.20
POT1.1	-8.82	-6.28	-7.18	-6.50	-6.18
Pirofosfatase acidocalcissomal	-6.20	-6.45	-6.93	-6.45	-5.37
Prostaglandina F2a sintase	-6.09	-5.69	-5.94	-6.27	-6.62
Farnesil difosfatesintase	-4.77	-7.06	-4.24	-6.23	-5.73
Glucoquinase	-5.02	-7.63	-6.58	-6.23	-6.46
POT1.2	-5.47	-6.90	-6.57	-6.19	-6.27
Histidil-tRNA sintetase	-5.86	-6.43	-6.79	-6.18	-5.43
Dihidrofolato redutase-Timidilato sintase	-6.47	-5.81	-7.94	-6.00	-6.74
Trans-sialidase	-6.90	-5.70	-6.14	-5.73	-5.73
Hipoxantina fosforibosil transferase	-6.22	-5.57	-5.54	-5.68	-4.87
Tripanotiona sintetase	-4.70	-5.11	-5.16	-5.32	-4.22
Glucose-6-fosfato isomerase	-3.66	-5.49	-5.02	-5.23	-4.11
Gliceraldeido-3-fosfato de hidrogenase	-6.08	-4.66	-4.78	-4.96	-5.06
Triosefosfato isomerase	-5.93	-5.17	-5.44	-4.70	-4.13
Piruvato quinase	-4.41	-4.29	-4.06	-4.45	-2.93
Dihidrorotato dehidrogenase	-4.64	-6.20	-4.67	-4.32	-4.21
Arginina quinase	-5.06	-5.00	-5.05	-4.26	-5.36
Ribose 5-fosfato isomerase tipo B	-3.93	-3.87	-4.50	-3.83	-3.25
Ciclofilina	-5.36	-3.81	-5.97	-3.59	-4.32
Superoxido desmutase	-4.54	-4.59	-5.83	-3.49	-4.53
Aquaporina	-3.05	-3.98	-4.23	-3.45	-4.29

* Os valores em negrito indicam os alvos mais prováveis de acordo com as energias de docagem. Os EC₅₀ dos compostos em relação a forma TS cepa Y também foi adicionado para facilitar a correlação entre os valores de docagem.

Além disso, foi encontrada uma correlação de Spearman entre a atividade tripanocida sobre as formas sanguíneas da cepa Y (valores de EC_{50}) e as energias de docagem do DNA ($r_s = 0,83$), indicativo de um alvo em potencial para esses compostos aromáticos (Bar-Haimet *et al.* 2009; Birkholtz *et al.* 2011). Os modos de ligação obtidos a partir da docagem destes compostos e pentamidina com o duplex de DNA estão apresentados na Figura 7.

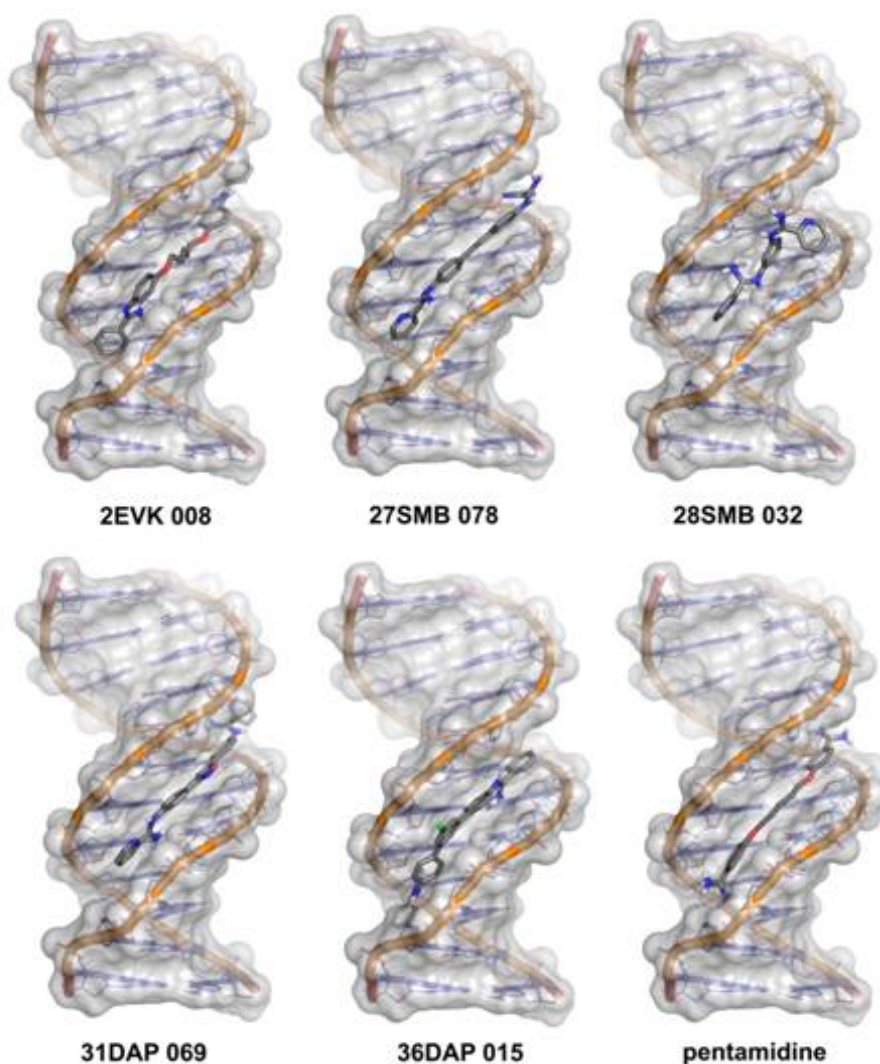


Figura 7. Modos de ligação obtidos a partir da docagem de diamidinas aromáticas dentro do sulco menor do DNA.

4.5.3 Análise de MEV e MET

As duas amidinas 31DAP069 e 36DAP015 exibiram um rápido perfil de ação, com EC_{50} inferior a 2 μ M após apenas 2 h de incubação. Além disso, uma molécula desta série (28SMB032) exibiu uma seletividade *in vitro* promissora contra diferentes DTUs de *T. cruzi* que nos levou a verificar as características ultraestruturais dos parasitos tratados por MEV e MET. Os achados em relação ao MEV estão dispostos na figura 8 e demonstram que 31DAP069 e 36DAP015 não induzem modificações morfológicas no parasito (Figura 8B e C) quando comparadas com os parasitos não tratados (Figura 8A). Em relação a 28SMB032, embora a maioria apresente um perfil semelhante ao não tratado (Figura 8 A1, A2), algumas alterações morfológicas foram observadas incluindo encurtamento (Figura 8 D1, D4) e torção (Figura 8 D2, D3) do corpo do parasito.

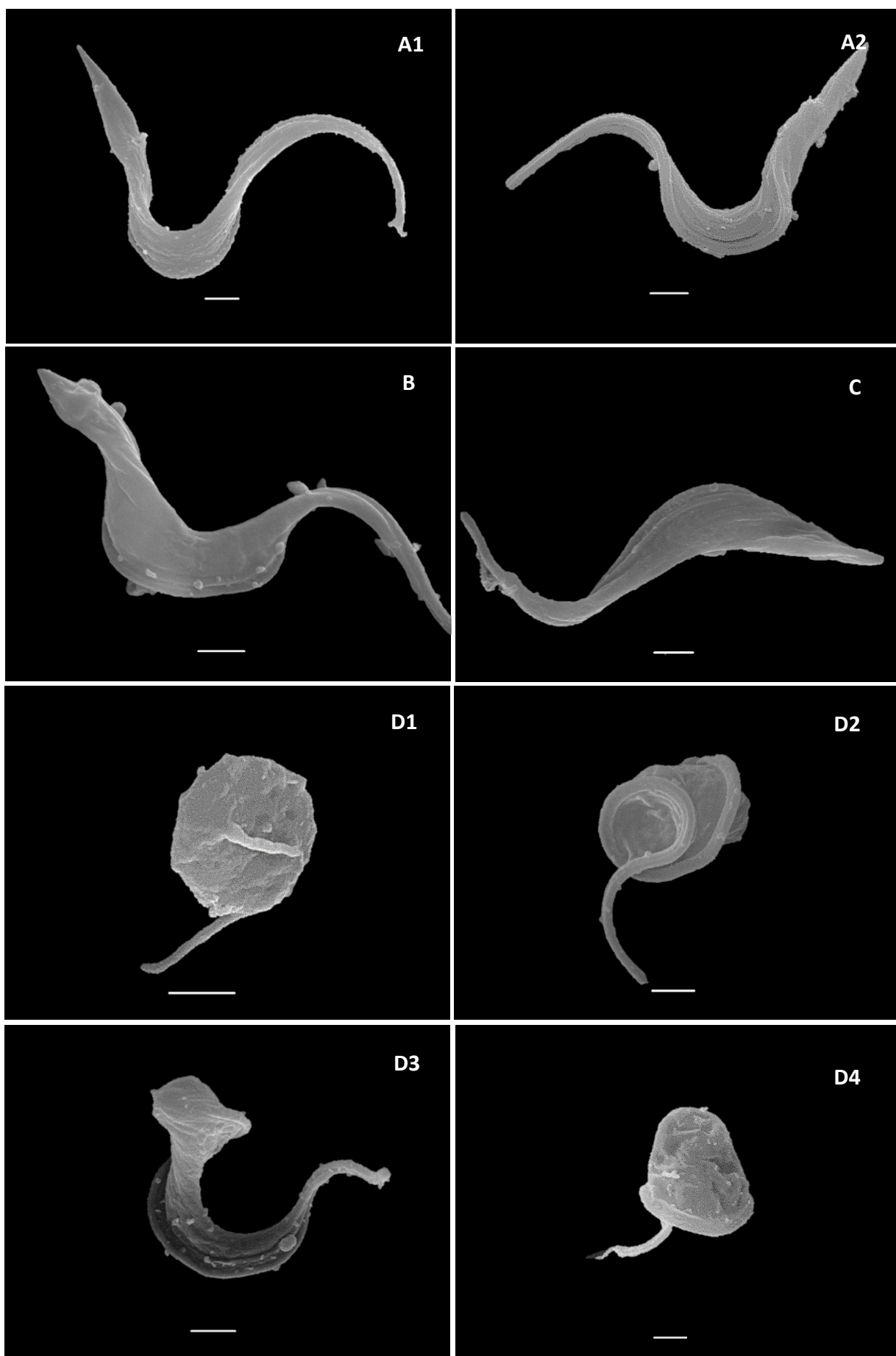


Figura 8. Microscopia eletrônica de varredura de TS de *T. cruzi* (cepa Y). Controle não tratado (A). O tratamento com 0.88 μM de 31DAP069 (B) 0.35 μM de 36DAP015 (C) e 10.48 μM de 28SMB032 (D) não resultou em alteração morfológica do parasito para B ou C; enquanto foi observada retração (D1-D4) e torção (D2, D3) do corpo do parasito em D. Barras = 1 μm

As imagens de MET revelam que, independentemente da sua potência *in vitro* (valores EC_{50}), as formas TS expostas a estes compostos amidínicos exibiram alterações celulares semelhantes (Figura 9 B1-D8). Enquanto que o parasito não tratado apresentou perfil ultraestrutural característico (Figura 9 A1, A2), os insultos mais frequentes nas formas tripomastigotas tratadas foram: (i) distensão da bolsa flagelar (Figura 9 B1, C4, D6); (ii) presença de membranas concêntricas (Figura 9 B2) e figuras de mielina (Figura 9 C2, B3, D4); (iii) um grande número de vesículas intracelulares (Figura 9 D4); (iv) distorções do Golgi (Figura 9 C1, D7); (v) distorção das membranas plasmáticas (Figura 9 D6) e nucleares (Figura 9 D8) e (vi) um perfil alterado do retículo endoplasmático envolvendo alguns componentes citoplasmáticos (Figura 9 C2, D3). Em contrapartida, nenhum dos compostos estudados induziu alterações nos núcleos e no DNA mitocondrial (kDNA) (Figura 9 D1, D2) nem perturbações no arranjo de microtúbulos sub-peliculares (Figura 9 D5).

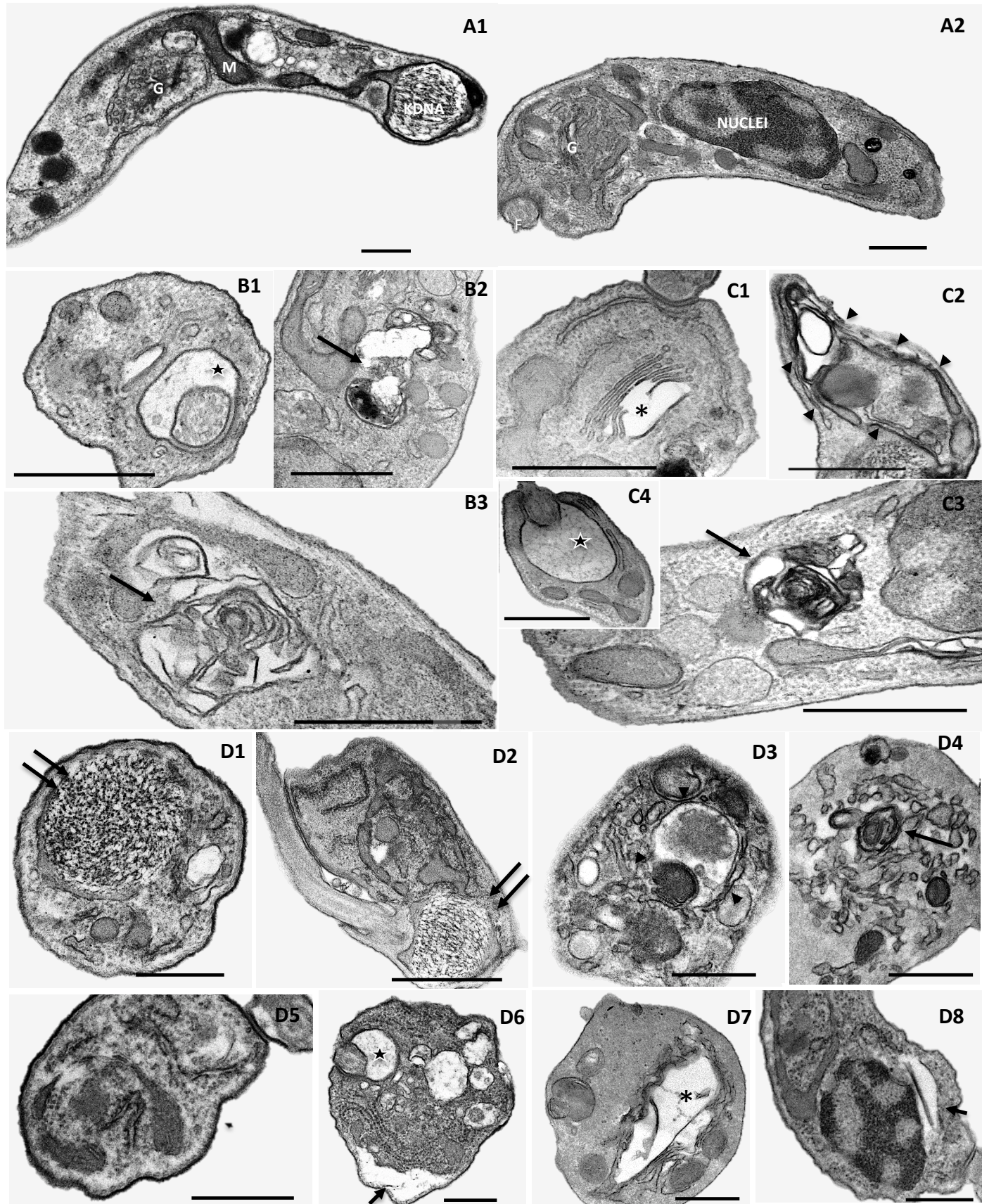


Figura 9. Efeitos ultraestruturais de AIAs em formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Controle não tratado (A1-A2) mostrando morfologia característica. O tratamento com 0.88 μM 31DAP069 (B), 0.35 μM 36DAP015 (C) e 10.48 μM 28SMB032 (D) resultou em várias alterações incluindo: dilatação da bolsa flagelar (estrela negra em B1, C4 e D6); estruturas membranares concêntricas e figuras de mielina no citosol (setas pretas em B2, B3, C3 e D4); disruptura do Golgi (asterisco em C1 e D7); retículo endoplasmático (RE) envolvendo estruturas citosólicas (pontas de seta em C2 e D3); desprendimento da membrana plasmática (flechas curtas em D8) e nuclear (flechas curtas em D6). Não foram detectadas alterações nos microtúbulos subpeliculares (setas finas em D5) e no kDNA do parasito (setas duplas em D1, D2). Golgi (G), Mitocôndria (M), Núcleo (N), Flagelo (F). Barras = 500 nm.

5. DISCUSSÃO

Propriedades desfavoráveis de farmacocinética e toxicidade (ADMET) representam uma das principais razões de falhas no processo de triagem de potenciais fármacos (van de Waterbeemd&Gifford 2003). Desta forma, é importante avaliar estes parâmetros, ainda que por ferramentas *in silico* nos estágios iniciais do processo de descoberta de novos medicamentos (Andrade *et al.* 2014, Braga *et al.* 2015). Como apresentado no bloco de resultados, o painel geral de ADMET realizado nos estudos de predição foi favorável a todos os compostos investigados na presente dissertação. Estas moléculas foram ainda submetidas a uma análise computacional adicional para identificar se poderiam ser classificadas como PAINS (Baell&Holloway 2010). Esta análise tem um valor substancial durante a seleção inicial de compostos, a fim de filtrar e eliminar os considerados promíscuos e formadores de agregados por interações não específicas (Baell&Walters 2014). Nenhuma das amidinas testadas foi classificada como PAINS e, portanto, todas possuem baixa probabilidade de ligar/inibir alvos inespecíficos e/ou exibir perfil promiscuo, fortalecendo a realização de estudos *in vitro* das moléculas em relação ao seu potencial anti-*T. cruzi*.

Além de *T. cruzi*, a atividade de AIAs contra outros tripanossomatídeos intracelulares como *L. donovani*, *L. amazonensis* e *L. major* já foi documentada (Rosypal *et al.* 2008, Wang *et al.* 2010, Pandharkaret *et al.* 2014). Como relatado na introdução, estudos anteriores do nosso grupo demonstraram que o número de grupos terminais dessas moléculas aromáticas tem um papel relevante na sua potência sobre *T. cruzi* (Soeiro *et al.* 2013). Como também já anteriormente abordado, algumas *bis*-AIAs (que apresentam dois grupos catiônicos terminais) são geralmente mais eficazes e menos tóxicas que *mono*-AIAs quando analisadas em experimentos *in vitro* e *in vivo* (de Araújo *et al.* 2014), estimulando a continuidade das investigações quanto o potencial de ação antiparasitária de novas *bis*-AIAs. O presente estudo confirma o efeito promissor destes agentes sintéticos contra *T. cruzi in vitro*, exibindo um perfil de atividade dependente de tempo e para a maioria deles, uma superior potência que o Bz. A molécula 28SMB032 mostrou efeito anti-*T. cruzi* semelhante ao fármaco de referência (Bz) quando testado sobre a cepa Y (para ambos as formas do parasito relevantes para infecção de mamíferos: as formas multiplicativas intracelulares além das formas tripomastigotas presentes na

circulação sanguínea) e um efeito ainda superior ao Bz em relação aos parasitos intracelulares da cepa Tulahuen (EC_{50} 0.5 vs 4 μ M para as AIAs e Bz, respectivamente). Outra característica já relatada para estas *bis*-AIA foi o rápido perfil de ação: 31DAP069 e 36DAP015 apresentam valores EC_{50} inferiores a 2 μ M após curtos períodos de exposição como 2 horas de incubação, corroborando com achados anteriores referentes a esta classe (Soeiro *et al.* 2013). A atividade dos mesmos contra formas intracelulares das cepas Tulahuen e Y e sobre as formas sanguíneas da cepa Y também atingiu as expectativas relacionadas a definição de um composto “hit” para DC ($EC_{50} \leq 10 \mu$ M e IS a partir de 10) (Katsuno *et al.* 2015). Infelizmente, a maioria dos demais compostos estudados apresentou elevada toxicidade *in vitro* e alguns precipitaram em baixas concentrações e, deste modo, apenas 28SMB032 foi selecionada para prosseguir ao longo da triagem fenotípica, tendo apresentado seletividade de 54-285, cumprindo critérios fenotípicos de eficácia de composto hit para DC (Romanha *et al.* 2010, de Araújo *et al.* 2014).

Outra abordagem recomendada para terapia de diversas patologias, incluindo aquelas de origem parasitária tem sido a associação de fármacos. Assim, presentemente avaliamos esta estratégia que visa atenuar a toxicidade, otimizar o efeito microbicida desejado atingindo diferentes alvos metabólicos e/ou atuando sobre diferentes formas do parasito e fases da doença além de reduzir a chance de resistência adquirida aos medicamentos em curso (Coura 2009). Desta forma, combinamos 28SMB032 com Bz, e seguindo a metodologia descrita por Fivelman (Fivelman *et al.* 2004) obtivemos o $x\Sigma$ FICI de 0,95 que é indicativo de ausência de interação de acordo com Odds (Odds 2003), resultado que pode ser proveitoso tendo em vista as vantagens acima relatadas, visando promoção do efeito anti-*T. cruzi* que futuramente poderá ser testado sobre modelos experimentais *in vivo*.

Um importante resultado a ser enfatizado refere-se a potência da 28SMB032 (EC_{50} 1.5 μ M) mediante uso de culturas de células cardíacas infectadas pela cepa Y avaliada pela microscopia óptica com uso de coloração por Giemsa. A atividade que se revelou semelhante ao Bz (tabela 5) refletiu diminuição da porcentagem de células hospedeiras infectadas e do número de parasitos por célula, o que confere a esta molécula uma ação tripanocida. Este aspecto de ação que resulta na redução do percentual total de células, representa um fator crucial visando evitar possíveis recidivas decorrentes de focos residuais de parasitos que tiveram seu metabolismo afetado sobre os índices de multiplicação (número de parasitos por células), mas

que após a retirada do fármaco conseguem restabelecer a proliferação dando assim continuidade e manutenção da infecção nas células hospedeiras (Ercoli 1980, Kaiser *et al.* 2015). A soma destes resultados encorajadores impulsionou o prosseguimento para ensaios *in vivo* com 28SMB032. No entanto, as expectativas dos resultados *in vitro* não se traduziram no modelo animal experimental. Infelizmente, os camundongos infectados com *T. cruzi* e tratados com esta amidina resultaram em morte rápida, demonstrando que como já intensamente discutido em revisões sobre esta temática (Konar&Chatelain, 2015), nem sempre há uma tradução direta entre os dados observados em modelos matemáticos (*in silico* no qual a toxicidade oral aguda predita para 28SMB032 foi 195 mg/kg) e mesmo fenotípicos *in vitro* (seletividade superior a 54) e os efeitos tóxicos observados *in vivo*. O grupo de camundongos submetidos ao tratamento com 1-10 mg/kg exibiu alta taxa de mortalidade (> 83%) dentro de 24 horas após o tratamento. O animal sobrevivente apresentou sintomas neurotóxicos caracterizados por falta de coordenação motora, perda de controle urinário e convulsão. Por necropsia foi observada forte hemorragia gastrointestinal, coloração amarelada do fígado e atrofia dos rins exibindo cor laranja sugestiva de lesão renal. Nenhuma alteração morfológica foi encontrada no cérebro; também não foram observadas alterações circulatórias. Estes achados sugerem sintomas clínicos neurotóxicos associados à insuficiência renal aguda.

Em relação ao que se tem observado com uso de *high throughput screening* (HTS) e *high content screening* (HCS) (neste caso para com sistemas de imagem *in vitro* e *in vivo*) além da síntese direcionada a alvos específicos, a análise fenotípica sobre o sistema celular a partir de quimiotecas ou de bibliotecas de produtos naturais é ainda uma das melhores ferramentas para identificar com sucesso um novo fármaco (Katsuno *et al.* 2015) Em complemento, anotações sobre os mecanismos de ação e alvos celulares permitem gerar informações que possibilitem melhorar o perfil (eficácia, segurança, farmacológico, por exemplo) do candidato através do desenho de novos análogos e derivados. No entanto, a determinação de alvos através de ensaios celulares e moleculares é uma tarefa desafiadora e laboriosa, exigindo grandes quantidades de proteínas purificadas. Desta forma, as abordagens computacionais de “target fishing” são importantes ferramentas no processo inicial de descoberta de fármacos, pois direcionam a descoberta de potenciais alvos através da seleção de um pequeno conjunto de alvos putativos pela docagem molecular. Em nossa análise, os cinco principais alvos previstos foram

extraídos do banco de dados relacionado a tripanosomatídeos e de resultados obtidos com amidinas aromáticas disponíveis na literatura (Soeiro *et al.* 2013). Todavia, análises moleculares e bioquímicas mais profundas e sua validação dos alvos são necessárias ao longo da progressão do fluxograma de descoberta de novos medicamentos visando complementar e confirmar os modelos matemáticos. Para a obtenção de informações morfológicas iniciais acerca dos elementos celulares primariamente afetados pelos compostos estudados, realizamos as técnicas de MEV e MET utilizando os valores referentes ao EC₅₀ de cada composto após 24 h de incubação, porém por tempo curto de exposição (apenas 2 h). Esta análise permite explorar e identificar os danos ultraestruturais mais precoces e frequentes deflagrados pelas AIAs. Realizamos nossos ensaios utilizando a forma sanguínea da cepa Y e três compostos foram selecionados com base em (i) modo de ação rápido contra tripomastigotas (31DAP069 e 36DAP015) e (ii) melhor perfil de seletividade contra distintas formas e cepas.

Nossos estudos *in silico* mostraram uma forte predição quanto à afinidade das AIAs com o DNA. Em concordância, os dados da literatura demonstram que as amidinas clássicas como pentamidina (Nunn *et al.* 1993) e alguns análogos (Chai *et al.* 2014) interagem fortemente com o sulco menor do DNA, resultando na perda de funcionalidade da molécula. A eficácia deste reconhecimento forneceu uma estratégia útil para a concepção do desenho e síntese de novos agentes antiparasitários (Soeiro *et al.* 2013). Dados anteriores relacionados à outras amidinas aromáticas demonstraram alterações mitocondriais e fragmentação de kDNA (Soeiro *et al.* 2010). Dados sugerem que os átomos de nitrogênio protonados dos grupos imino podem interagir via interações eletrostáticas e através de ligações de hidrogênio com bases sequenciais compostas por adenina e timina localizadas na superfície do DNA. Provavelmente, quando os compostos interagem com esta região do DNA, ocorre o deslocamento da maior parte das moléculas de água presentes (Yuan *et al.* 1992, Nunn *et al.* 1993). A interpretação racional dos nossos resultados de docagem sugere interação dos compostos estudados com o sulco menor do DNA. A flexibilidade ou conformação "V" adquirida pelos compostos com meta-substituintes no anel central pode ser fator crucial para esta ligação, corroborando com os valores de docagem e de EC₅₀ experimentais.

Por outro lado, observou-se através de estudos termodinâmicos (como desnaturação térmica (T_m) e dicróismo circular) a falta de correlação entre a

potência de várias *bis*-AAs em estudos *in vitro* e a força de associação a sequencias de DNA e mesmo frente ao kDNA purificado de *T. cruzi* (Daliry *et al.* 2011). No entanto, apesar de vários destes potentes agentes tripanocidas serem considerados fracos ligantes de DNA, muitas *bis*-AAs como a DB766 e a DB1831 são capazes de induzir impactantes alterações na topologia do DNA e do KDNA, possivelmente resultando na perda da viabilidade molecular e de sua funcionalidade através da perturbação da interação dos ácidos nucleicos com fatores de transcrição e / ou outros ligantes conduzindo, deste modo, danos e morte do parasito. (Daliry *et al.* 2011). Importante destacar que a seletividade das amidinas e AAs sobre ácidos nucleicos de kinetoplastídeos em relação aos de células de mamíferos decorre do maior número de sequencias AT no KDNA em relação ao DNA nuclear (Wilson *et al.* 2008).

Em relação aos outros cinco alvos previstos nos nossos estudos *in silico* (tabela 8), a UDP-galactopiranosmutase (UGM) é uma flavoenzima que catalisa a conversão de UDP-galactopiranosose em UDP galactofuranose (Galf). Galf é um componente de glicolipídeos e glicoproteínas na superfície celular de muitos agentes microbianos, incluindo *T. cruzi*, e que tem sido implicado na patogênese do parasito (Pereira-Chioccola *et al.* 2000). Galf não é encontrada em humanos, tornando sua via biosintética um alvo atrativo para o desenvolvimento de novos fármacos contra *T. cruzi* (Oppenheimer *et al.* 2012). No entanto, não há relato na literatura de inibidores de UDP para *T. cruzi*, porém dados da literatura mostram que derivados de galactanofuranosídeo induzem importantes alterações celulares que levam a danos extensos de organelas citoplasmáticas como núcleo, cinetoplastos, mitocôndrias e compartimentos de armazenamento em promastigotas de *Leishmania donovani*, (Suleman *et al.* 2014).

Outro alvo hipotético identificado pela nossa análise *in silico* é a enzima 14 α -desmetilase (CYP51), um citocromo que catalisa a remoção oxidativa do grupo 14 α -metil a partir de precursores de esterois ciclizado, sendo sua inibição resultando além da falta de produção de esteróis, no acúmulo de esteróis citotóxicos metilados (Urbina, 2009; Lepesheva *et al.* 2011). A CYP-51 tem sido amplamente explorada no desenvolvimento de fármacos antifúngicos. A similaridade na composição e biossíntese de esteróis de fungos e *T. cruzi* sendo para este último, elementos essenciais para sua viabilidade e proliferação celular, proporcionou uma base experimental para explorar o potencial de inibidores de CYP51 como agentes

tripanocidas (Doyle *et al.* 2010, Lepesheva&Waterman 2011, Andriani *et al.* 2013). A exposição de formas epimastigotas de *T. cruzi* ao posaconazol levou a alterações ultraestruturais e morfológicas como: formação de vesículas na membrana flagelar e desorganização da bolsa flagelar, alteração de cisternas de Golgi, perda de compactação de kDNA, insultos na membrana plasmática e contorção do corpo do parasito, dentre outros (Veiga-Santos *et al.* 2012). Algumas destas alterações ultraestruturais (como distensão da bolsa flagelar, distorções dos elementos de Golgi, desprendimento da membrana plasmática e envolvimento nuclear) também foram encontradas em formas tripomastigotas presentemente incubadas com as amidinas ora estudadas. Curiosamente, um estudo recente relatou que a *bis*-AIA DB766 altera a via biossintética de lipídios em *Leishmania* (Pandharkar *et al.*, 2014). Outra característica interessante que observamos na dissertação foi a presença de membranas concêntricas e figuras de mielina, grande número de vesículas intracelulares e perfil de retículo endoplasmático envolvendo componentes citoplasmáticos em parasitos tratados com as AIs. Alterações semelhantes foram encontradas quando formas sanguíneas de *T. cruzi* foram incubadas com inibidores do CYP51 (VNI) (Soeiro *et al.* 2013b) e são indicativas de um fenótipo morfológico de autofagia que necessita ser melhor investigado. Infelizmente, dois azóis inibidores da CYP51, o posaconazol e o pró-fármaco do ravuconazol foram recentemente avaliados em ensaios clínicos para o estágio crônico da DC, mas a potência destes nos estudos pré-clínicos não se traduziu em desfechos clínicos, o que novamente destaca a nem sempre correlação entre dados experimentais e os observados em portadores (Urbina 2015, Molina *et al.* 2015).

O quarto principal alvo previsto por docagem foi a proteína farnesiltransferase (FT). A FT é uma enzima que atua na prenilação da proteína pela transferência da porção farnesil para a cisteína C-terminal da proteína alvo, desempenhando papel na ligação proteína-proteína através do domínio de ligação prenil (Yokoyama *et al.* 1997). Inibidores da farnesiltransferase (IFTs) têm sido utilizados como uma estratégia-alvo para a terapia de câncer (Sebti *et al.* 2004). Os IFTs também representam alvos potenciais para a terapia de doenças infecciosas como malária (cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*) além de algumas as causadas por tripanossomatídeos (Moorphy *et al.* 2013). De fato, as FT de tripanossomatídeos são maiores que as de mamífero e têm especificidades de substrato diferentes de mamíferos, tornando-as potenciais alvos terapêuticos (Buckner 2002). IFTs afetam o

crescimento de formas intracelulares de *T. cruzi* (Yokoyama *et al.* 1998), e podem desencadear autofagia (Pan *et al.* 2008); além de aumentar a acetilação de tubulina em terapia combinada contra células cancerosas (Marcus *et al.* 2005). Cabe ressaltar que morte celular programada por apoptose já foi observada em *T. cruzi* exposto a furamidina e análogo (DB569) (De Souza *et al.* 2007). Este é um importante aspecto quando se leva em consideração que morte por suicídio celular não requer inflamação massiva, o que pode ser substancial em patologias crônicas progressivas como DC (De Souza *et al.* 2007).

A espermidina sintase (SdpS), o último dos cinco alvos previstos, é uma enzima importante para a biossíntese de espermidina, ligando putrescina a S-adenosilmetionina descarboxilada para formar esta poliamina (Maya *et al.* 2014). Juntamente com outras poliaminas, como putrescina e espermina, elas são moléculas essenciais para o crescimento e sobrevivência celular. A espermidina, por exemplo, é um indutor fisiológico da autofagia em células eucarióticas, aumentando a colonização do hospedeiro pelo parasito (Vanrell *et al.* 2013). L-arginina, o substrato primário da biossíntese de espermidina, previne a morte celular programada em epimastigotas de *T. cruzi* induzida por NOS (Piacenza *et al.* 2001). Em *T. cruzi*, a espermidina e a putrescina estão associadas à proteção contra lipoperoxidação sob estresse oxidativo induzido por drogas nitro-heterocíclicas (Hernandez *et al.* 2006) e soro humano (Piacenza *et al.* 2001). Além disso, os transportadores de espermidina e de putrescina TcPOT1.1 e 1.2 foram propostos como alvos terapêuticos parasitários promissores. Relatos anteriores alegaram que a via de biossíntese de poliaminas é um dos alvos de pentamidina em *Leishmania* (Basselinet *et al.* 1997).

Há um rápido crescimento de bases de dados de bioatividade e o uso de métodos computacionais para prever alvos de proteínas nos últimos anos. Métodos baseados em estruturas são frequentemente usados para explorar a informação estrutural da proteína e as funções de pontuação por docagem molecular para prever pares de ligante-alvo (Koutsoukas *et al.* 2011). Além do mais, são ferramentas amplamente presentes na avaliação do alvo e descoberta de compostos em potencial (Lima 2016, Sacconay *et al.* 2014, Neres *et al.* 2009), e preconizadas como recursos complementares para predição de alvos e novos fármacos (Katsuno *et al.* 2015). No entanto, este recurso não pode ser utilizado de forma isolada e única. Como mostrado na presente dissertação, não houve uma tradução direta

entre achados *in silico* e a análise ultraestrutural que não apoiaram as evidências de que o DNA do parasito (presente no núcleo e mitocôndria) seja principal alvo primário dessa série de amidinas. Mesmo os compostos mais rápidos e potentes (31DAP069, 36DAP015 e 28SBM032, respectivamente) não induziram alterações detectáveis na organização estrutural do DNA. Dentre as possibilidades têm-se que, o MET não seja suficientemente sensível para detectar alterações menores na topologia do ácido nucléico do parasito e / ou não haja tradução entre ensaios *in silico* e celulares em questão e que carecem então de estudos mais extenso de modo a explorar alvos celulares e mecanismos de ação destas moléculas aromáticas.

Assim, no presente projeto de mestrado utilizamos diferentes ferramentas (*in vitro*, *in silico* e *in vivo*) para avaliar a atividade biológica anti-*T. cruzi* e o perfil preditivo farmacocinético de 6 *bis*-AIAs. Embora demonstrem características *in vitro* e *in silico* bastante promissoras, houve uma falta de reciprocidade com achados *in vivo* relacionados ao perfil de segurança (toxicidade) reforçando a importância de estudos pré-clínicos profundos para excluir os elementos farmacológicos tóxicos e não eficazes já nas primeiras etapas de ensaios pré-clínicos. Desta forma, pode-se evitar ou reduzir o insucesso observado em ensaios clínicos com o nitroderivado fexinidazol para DC (Bahia *et al.* 2012, Drugs for Neglected Diseases Initiative-Annual report 2015). Uma vez que faltam terapias alternativas para esta doença negligenciada, os nossos dados e antecedentes estimulam e justificam o rastreamento de novos análogos na tentativa de superar a toxicidade e melhorar a eficácia das moléculas contra *T. cruzi* com intuito de encontrar uma alternativa de tratamento eficaz para qualquer fase desta silenciosa e progressiva patologia.

Sobre o ponto de vista da biologia celular e mecanismo de ação desta classe de compostos, sugerimos como perspectiva um aprofundamento de suas vias de ação sobre *T. cruzi* através de estudos bioquímicos e termodinâmicos (ex. com kDNA purificado), dados que ajudarão no melhoramento do desenho destas moléculas e, por consequência, na sua ação biológica sobre diferentes formas e cepas do parasito.

6. CONCLUSÕES

- Estudos matemáticos revelaram que todas as arilimidamidas testadas apresentam um bom perfil global de propriedades ADMET *in silico*, além de serem preditas como não agregadoras (PAINS). As AIAs exibiram perfil de ação tripanocida *in vitro* sobre diferentes DTUs de *T. cruzi* com potência igual ou superior ao fármaco de referência (benzonidazol) sobre as formas amastigotas e tripomastigotas,
- Os compostos 2EVK008, 31DAP069 e 36DAP015 exibiram um perfil de ação rápida *in vitro* sobre formas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) com excelente ação com apenas 2 horas de exposição, sendo as duas últimas as mais potentes ($EC_{50} < 2\mu M$),
- A AIA 28SMB032 revelou alta toxicidade *in vivo* pela alta taxa de mortalidade após uma única administração na menor concentração testada (1mg/Kg). A necropsia realizada sugere falha renal,
- A predição de alvos moleculares *in silico* através de docagem molecular atribuiu um alto valor de energia de afinidade entre os compostos e o DNA, em comparação com o valor de afinidade da molécula-mãe desta classe, a pentamidina. Entretanto, não foi constatada nenhuma alteração ultraestrutural do DNA mitocondrial ou nuclear sendo possível que a MET possa não ser sensível para detectar pequenas alterações nos ácidos nucleicos. Outra alternativa seria a falta de correlação entre os achados matemáticos e os detectados pelas análises ultraestruturais,
- Os resultados observados por MET, como profusão de vesículas no citoplasma, presença de membranas concêntricas e figuras de mielina no citoplasma e retículo endoplasmático envolvendo componentes celulares são indicativos de morte celular por autofagia. Técnicas de citometria de fluxo poderão ser futuramente aplicadas a fim de explorar mais profundamente o tipo de morte celular deflagrada no parasito,

- Resultados da terapia combinada sugerem ausência de interação entre o fármaco de referência (Bz) e a AIA 28SMB032 o que representa vantagens a serem exploradas frente a possibilidade de estabelecer ação antiparasitária com redução de doses e conseqüentemente menor toxicidade e otimização do tratamento pela possibilidade de atuação em diferentes alvos,
- O conjunto dos nossos dados contribue para melhor entendimento acerca do perfil de ação dos compostos testados e para a otimização desta classe de moléculas através de parcerias com laboratórios de química medicinal e farmacologia tais como o do nosso colaborador Dr. Tidwell, visando a busca de agentes mais promissores para o tratamento da DC.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Andrade CH, Silva DC, Braga RC. *In silico* Prediction of Drug Metabolism by P450. *Curr Drug Metab* 2014; 15: 514–525.

Andriani G, Amata E, Beatty J, *et al.* Antitrypanosomal lead discovery: Identification of a ligand-efficient inhibitor of *Trypanosoma cruzi* CYP51 and parasite growth. *Journal of medicinal chemistry*. 2013;56(6):2556-2567. doi:10.1021/jm400012e.

Apweiler R, Bairoch A, Wu CH, Barker WC, Boeckmann B, *et al.* UniProt: the Universal Protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D115–D119.

Baell JB, Holloway GA. 2010. New substructure filters for removal of pan assay interference compounds (PAINS) from screening libraries and for their exclusion in bioassays. *J Med Chem* 53: 2719–2740.

Baell J, Walters MA. 2014. Chemistry: Chemical con artists foil drug discovery. *Nature* 513: 481–483.

Bambino-Medeiros R, Oliveira FO, Calvet CM, Vicente D, Toma L, Krieger MA, Meirelles MN, Pereira MC. 2011. Involvement of host cell heparan sulfate proteoglycan in *Trypanosoma cruzi* amastigote attachment and invasion. 138(5):593-601. doi: 10.1017/S0031182010001678.

Banks JL, Beard HS, Cao Y, Cho AE, Damm W, *et al.* Integrated Modeling Program, Applied Chemical Theory (IMPACT). *J Comput Chem* 2005; 26: 1752–1780.

Bar-Haim S, Aharon A, Ben-Moshe T, Marantz Y, Senderowitz H. SeleX-CS: A new consensus scoring algorithm for hit discovery and lead optimization. *J Chem Inf Model* 2009; 49: 623–633.

Basselin M, Badet-Denisot MA, Lawrence F, Robert-Gero M. Effects of pentamidine on polyamine level and biosynthesis in wild-type, pentamidine-treated, and pentamidine-resistant *Leishmania*. *Exp Parasitol*. 1997; 85(3):274-82. DOI: 10.1006/expr.1996.4131.

Batista DDGJ, Batista MM, Oliveira GM, Amaral PB, Lanes-Vieira J, Britto C, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MN. Arylimidamide Db766: A potential chemotherapeutic 1 candidate for chagas disease treatment. *antimicrobial agents and chemotherapy* 2010a; 54, P. 2940-2952.

Batista DG, Pacheco MG, Kumar A, Branowska D, Ismail MA, Hu L, Boykin DW, Soeiro MN. Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 2010b; 137(2): 251-9.

Batista, D. G. J., Batista, M. M., de Oliveira, G. M., Britto, C. C., Rodrigues, A. C., Stephens, C. E., Boykin, D.W. and Soeiro, M. N. C. Combined treatment of heterocyclic analogues and benznidazole upon *Trypanosoma cruzi in vivo*. *PLoS One* 2011;6 e22155.

Biasini M, Bienert S, Waterhouse A, Arnold K, Studer G, et al. SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: W252–W258.

Birkholtz LM, Williams M, Niemand J, Louw AI, Persson L, et al. Polyamine homeostasis as a drug target in pathogenic protozoa: peculiarities and possibilities. *Biochem J* 2011; 438: 229–244.

Bozic I, Reiter JG, Allen B, Antal T, Chatterjee K, Shah P, ... Nowak MA. Evolutionary dynamics of cancer in response to targeted combination therapy. *eLife* 2013;2, e00747. <http://doi.org/10.7554/eLife.00747>.

Braga RC, Alves VM, Silva MFB, Muratov E, Fourches D, et al. Tuning hERG out: Antitarget QSAR Models for Drug Development. *Curr Top Med Chem* 2014; 14:

1399–1415.

Braga RC, Alves VM, Silva MFB, Muratov E, Fourches D, *et al.* Pred-hERG: A Novel web-Accessible Computational Tool for Predicting Cardiac Toxicity. *Mol Inform* 2015; 34: 698–701.

Braga RC, Alves VM, Silva FC, Andrade CH. In silico methods for prediction of drug metabolism. In: Lyubimov A, editor. *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc 2015; 1–20.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review of Microbiology*. 1973. Vol. 27: 347-382. DOI: 10.1146/annurev.mi.27.100173.002023.

Buckner FS, Eastman RT, Nepomuceno-Silva JL, Speelman EC, Myler PJ, Van Voorhis WC, Yokoyama K. Cloning, heterologous expression, and substrate specificities of protein farnesyltransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 2002; 122; 181-188.

Campos MCO, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2014; 193(1):17-19. doi:10.1016/j.molbiopara.2014.01.002.

Castro JA, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006; 25(8):471-9.

Cereto-Massagué A, Ojeda MJ, Valls C, Mulero M, Pujadas G, *et al.* Tools for in silico target fishing. *Methods* 2015 71: 98–103.

CDC, 2016. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>, acessado em 27/10/2016.

Chatelain E. 2015. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen* 20:22–35. <http://dx.doi.org/10.1177/1087057114550585>.

Chatelain E & Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. Dove press: 2015; 9 4807–4823. <https://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S90208>

Cheng F, Yu Y, Shen J, Yang L, Li W, *et al.* Classification of Cytochrome P450 Inhibitors and Noninhibitors Using Combined Classifiers. *J Chem Inf Model* 2011; 51: 996–1011.

Cheng F, Li W, Zhou Y, Shen J, Wu Z, *et al.* admetSAR: a comprehensive source and free tool for assessment of chemical ADMET properties. *J Chem Inf Model* 2012; 52: 3099–3105.

Chirac P, Torreele E. Global framework on essential health R&D. *Lancet* 2006 367(9522)1560-1561. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68672-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68672-8).

Conteh L, Engels T, Molyneux DH. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases 2010 *Lancet* 375:239–247. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)61422-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(09)61422-7).

Cortes HC, Müller N, Boykin D, Stephens CE, Hemphill A. *In vitro* effects of arylimidamides against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology*. 2011; 138:583–592. doi: 10.1017/S0031182011000114.

Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104(4):549-54. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000400002>.

Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 3 –24.

Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease—100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104:31–40. Coura

JR, Dias JCP. 2009. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease—100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104:31–40.

Daliry A, Pires MQ, Silva CF, Pacheco RS, Munde M, Stephens CE, Kumar A, Ismail MA, Liu Z, Farahat AA, Akay S, Som P, Hu Q, Boykin DW, Wilson WD, De Castro SL, Soeiro MNC. The trypanocidal activity of amidine compounds does not correlate with their binding affinity to *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA. *Antimicrob Agents Chemother*, 2011; 55, 4765-4773.

Da Silva CF, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MNC. *In vitro* trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2011a; 66, 1295–1297.

Da Silva CF, Daliry A, Silva PB, Akay S, Banerjee M, Farahat AA, Mary K, Fisher M K, Hu L, Kumar A, Liu Z, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MNC. The efficacy of arylimidamides against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Parasitology* 2011b; 138, 1863–1869.

Da Silva CF, Batista DdGJ, Oliveira GM, de Souza EM, Hammer ER, *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*, 2012; 7(1): e30356.

De Araújo JS, Da Silva CF, Batista DGJ, Da Silva PB, Meuser MB, Aiub CAF, Da Silva MFV, Araújo-Lima CF, Banerjee M, Farahat AA, Stephens CE, Kumar A, Boykin DW and Soeiro MNC. *In vitro* and *in vivo* studies of the biological activity of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014; 58(7), 4191-4195.

De Souza EM, Menna-Barreto R, Araújo-Jorge TC, Kumar A, Hu Q, Boykin DW, Soeiro MNC 2006b. Antiparasitic activity of aromatic diamidines is related to apoptosis-like death in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 133: 75-79.

De Souza EM, Oliveira GM & Soeiro MCN. Electrocardiographic findings in acutely and chronically *T. cruzi*-infected mice treated by a phenyl-substituted analogue of furamidine DB569. *DrugTarget Insights* 2007; 2, 61–69.

De Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94 Suppl 1:17-36.

De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104(Suppl. I):89-100.

de Souza W, de Carvalho TMU & Barrias ES. “Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction,” *International Journal of Cell Biology* 2010; Article ID 295394, 18 pages. doi:10.1155/2010/295394.

Díaz M V, Miranda MR, Campos-Estrada C, Reigada C, Maya JD, et al. Pentamidine exerts in vitro and in vivo anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2014; 134: 1–9.

Doyle, PS, Chen, C-K, Johnston JB, Hopkins SD, Leung SSF, Jacobson MP, ... Podust LM. A nonazole Cyp51 inhibitor cures Chagas' disease in a mouse model of acute infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010; 54(6), 2480–2488. <http://doi.org/10.1128/AAC.00281-10>

Don, R. & Ioset, J. R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* 2013; 141, 140–146.

Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi). Annual report 2015. From neglected diseases to neglected patients and populations. Retrieved 2/08/2016 from: http://www.dndi.org/wp-content/uploads/2016/08/DNDi_AR_2015.pdf

Drwal MN, Banerjee P, Dunkel M, Wettig MR, Preissner R. ProTox: a web server for the in silico prediction of rodent oral toxicity. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: W53–W58.

Eldridge MD, Murray CW, Auton TR, Paolini G V, Mee RP. Empirical scoring functions: I. The development of a fast empirical scoring function to estimate the binding affinity of ligands in receptor complexes. *J Comput Aided Mol Des* 1997; 11: 425–445.

Ercoli N, Iudice G. Trypanostatic Drug Action: Its Relation to Relapse Following Chemotherapy. *Chemotherapy* 1980; 26: 218–223 (DOI:10.1159/000237908).

Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):755-9.

Fivelman QL, Adagu IS, Warhurst DC. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 4097–102.

Friesner RA, Banks JL, Murphy RB, Halgren T, Klicic JJ, *et al.* Glide: a new approach for rapid, accurate docking and scoring. 1. Method and assessment of docking accuracy. *J Med Chem* 2004; 47: 1739–1749.

Goodsell D, Dickerson RE. Isohelical analysis of DNA groove-binding drugs. *Journal of Medicinal Chemistry.* 1986; 29:727–733.

Guhl F, Ramírez JD 2011. *Trypanosoma cruzi* I diversity: towards the need of genetic subdivision? *Acta Trop* 119: 1-4.

Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 115-23.

Hansen K, Mika S, Schroeter T, Sutter A, ter Laak A, *et al.* Benchmark Data Set for in Silico Prediction of Ames Mutagenicity. *J Chem Inf Model* 2009; 49: 2077–2081.

Hotez PJ, Fujiwara RT. 2014. Brazil's neglected tropical diseases: an overview and a report card. *Microbes Infect.* 16(8):601-6. doi: 10.1016/j.micinf.2014.07.006.

Hotez PJ. NTDs V. 2.0: “blue marble health”—neglected tropical disease control and elimination in a shifting health policy landscape. *PLoS Negl. Trop. Dis* 2013 7(11): e2570.

Hotez PJ, Alvarado M, Basanez MG, Bolliger I, Bourne R, *et al.* The Global Burden of Disease Study 2010: Interpretation and Implications for the Neglected Tropical Diseases. *PLoS Negl Trop Dis* 2014 8(7): e2865. doi:10.1371/journal.pntd.0002865.

Jenkins JL, Bender A, Davies JW. In silico target fishing: Predicting biological targets from chemical structure. *Drug Discov Today Technol* 2006; 3: 413–421.

Jones HE, Blundell GK, Tidwell RR, Hall JE, Farr SJ, Richards RJ. The accumulation of pentamidine and the toxic effects of the drug, its selected analogues and metabolites on isolated alveolar cells. *Toxicology.* 1993; 4:80(1):1-12.

Hernandez, SM, Sanchez, MS, de Tarlovsky MN. Polyamines as a defense mechanism against lipoperoxidation in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.*, 2006; 98(1), 94-102.

M, Mäser P, Tadoori LP, Ioset J-R, Brun R. Antiprotozoal Activity Profiling of Approved Drugs: A Starting Point toward Drug Repositioning. Sullivan DJ, ed. *PLoS ONE.* 2015; 10(8):e0135556. doi:10.1371/journal.pone.0135556.

Katsuno K, Burrows JN, Duncan K, Hooft van Huijsduijnen R, Kaneko T. Hit and lead criteria in drug discovery for infectious diseases of the developing world. *Nature Reviews Drug Discovery* 2015; 14:751–758. doi:10.1038/nrd4683.

Keenan, M.; Alexander, P. W.; Chaplin, J. H.; et al. Selection and Optimization of Hits from a High-Throughput Phenotypic Screen against *Trypanosoma cruzi*. *Future Med. Chem.* 2013; 5, 1733–1752.

Khanna, I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. *Drug Discov. Today* 2012; 17:1088–1102.

Koutsoukas A, Simms B, Kirchmair J, Bond PJ, Whitmore A V, et al. From in silico target prediction to multi-target drug design: current databases, methods and applications. *J Proteomics* 2011;74: 2554–2574.

Lagunin A, Filimonov D, Zakharov A, Xie W, Huang Y, et al. Computer-Aided Prediction of Rodent Carcinogenicity by PASS and CISOC-PSCT. *QSAR Comb Sci* 2009; 28: 806–810.

Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J Appl Crystallogr* 1993; 26: 283–291.

Lee J-M, Sarosy GA, Annunziata CM, Azad N, Minasian L, Kotz H, Squires J, Houston N, Kohn EC. Combination therapy: intermittent sorafenib with bevacizumab yields activity and decreased toxicity. *British Journal of Cancer*. 2010;102(3):495-499. doi:10.1038/sj.bjc.6605514.

Lepesheva GI & Waterman MR. Sterol 14alpha-Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2011; 11(16), 2060–2071.

Lima CR. In silico structural characterization of protein targets for drug development against *Trypanosoma cruzi*. *J Mol Model* 2016; 22(10):244. DOI: 10.1007/s00894-016-3115-9.

Mackey TK, Liang BA, Cuomo R, Hafen R, Brouwer KC, Lee DE. Emerging and Reemerging Neglected Tropical Diseases: a Review of Key Characteristics, Risk Factors, and the Policy and Innovation Environment. *Clinical Microbiology Reviews*. 2014 27(4):949-979. doi:10.1128/CMR.00045-14.

Marcus AI, Zhou J, O'Brate A, *et al.* The Synergistic Combination of the Farnesyl Transferase Inhibitor Lonafarnib and Paclitaxel Enhances Tubulin Acetylation and Requires a Functional Tubulin Deacetylase. *Cancer research*. 2005;65(9):3883-3893. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-3757.

Maya JD, Salas CO, Aguilera-Venegas B, Diaz MV, López-Muñoz R. Key proteins in the polyamine-trypanothione pathway as drug targets against *Trypanosoma cruzi*. *Curr Med Chem* 2014; 21: 1757–1771.

Meirelles MN, Araujo-Jorge TC, Miranda CF, De Souza W, and Barbosa HS. 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*. 1986; 41:198–206.

Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, De Castro SL. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron* 2009;40:157-168.

Menezes D, Valentim C. Oliveira MF, Vannier-Santos MA. Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 2006 98(2):99-105 DOI: 10.1007/s00436-005-0010-1

Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, Yeo M, Baleela R, Fitzpatrick S, Gaunt MW, Mauricio IL 2009. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology* 136: 1509-1528.

Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. The use of posaconazole against Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis.* 2015; 28(5):397-407. doi: 10.1097/QCO.0000000000000192.

Moraes CB, Giardini M, Kim H, Franco CH, Araujo-Junior AM, Schenkman S, Chatelain E, Freitas-Junior LH 2014. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep* 4 doi: 10.1038/srep04703.

Moorthy NS, Sousa SF, Ramos MJ, Fernandes PA. Farnesyltransferase inhibitors: a comprehensive review based on quantitative structural analysis. *Curr Med Chem.* 2013; 20(38):4888-923.

Moreno T, Pous J, Subirana JA, Campos JL. Coiled-coil conformation of a pentamidine–DNA complex. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* 2010; 66: 251–257.

Bahia MT, de Andrade IM, Martins TAF, *et al.* Fexinidazole: A Potential New Drug Candidate for Chagas Disease. Pollastri MP, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases.* 2012;6(11):e1870. doi:10.1371/journal.pntd.0001870.

Munday JC, Eze AA, Baker N, Glover L, Clucas C, *et al.* *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin 2 is a high-affinity transporter for pentamidine and melaminophenyl arsenic drugs and the main genetic determinant of resistance to these drugs. *J Antimicrob Chemother* 2014; 69: 651–663.

Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 93(2):203-14.

Murta SM, Krieger MA, Montenegro LR, Campos FF, Probst CM, Avila AR, Muto NH, de Oliveira RC, Nunes LR, Nirdé P, Bruna-Romero O, Goldenberg S, Romanha AJ 2006. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme

(TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with *in vitro*-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 146: 151-162.

Neres J, Brewer ML, Ratier L, Botti H, Buschiazzi A, Edwards PN, Mortenson PN, Charlton MH, Alzari PM, Frasch AC, Bryce RA, Douglas KT. Discovery of novel inhibitors of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase from *in silico* screening. 2009; 1;19(3):589-96. doi: 10.1016/j.bmcl.2008.12.065.

Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SM 2006. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with *in vitro*-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop* 100: 119-132.

Nunn CM, Jenkins TC, Neidle S. Crystal structure of d(CGCGAATTCGCG) complexed with propamidine, a short-chain homologue of the drug pentamidine. *Biochemistry* 1993;32: 13838–13843.

Nwaka, S. & Hudson, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat. Rev. Drug Discov* 2006; 5, 941–955.

Nyunt, MM, Hendrix CW, Bakshi RP, Kumar N & Shapiro TA. Phase I/II evaluation of the prophylactic antimalarial activity of pafuramidine in healthy volunteers challenged with *Plasmodium falciparum* sporozoites. *Am. J. Trop. Med. Hyg*2009; 80:528–535.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 1. DOI: 10.1093/jac/dkg301.

Oppenheimer M, Valenciano AL, Kizjakina K, Qi J, Sobrado P. Chemical mechanism of UDP-galactopyranose mutase from *Trypanosoma cruzi*: a potential drug target against Chagas' Disease. *PLoS ONE* 2012; 7(3): e32918. doi:10.1371/journal.pone.0032918.

Pacheco MG, Silva CF, Souza EM, Batista MM, Silva PB, Kumar A, Stephens CE, Boykin DW, and Soeiro MN. 2009. *Trypanosoma cruzi*: activity of heterocyclic cationic molecules *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 123: 73–80.

Paine MF, Wang MZ, Generaux CN, Boykin DW, Wilson WD., De Koning HP, Olson CA, Pohlig G, Burri C, Brun R, Murilla GA, Thuita JK, Barrett MP and Tidwell RR. Diamidines for human African trypanosomiasis. *Current Opinions in Investigational Drugs* 2010;11, 876–883.

Pan J, Chen B, Su CH, Zhao R, Xu ZX, Sun L, Lee MH, Yeung SC. Autophagy induced by farnesyltransferase inhibitors in cancer cells. *Cancer Biol Ther.* 2008 Oct;7(10):1679-84. PMID: 18769123

Pandharkar T, Zhu X, Mathur R, Jiang J, Schmittgen TD, Shaha C, Werbovetz KA. Studies on the antileishmanial mechanism of action of the arylimidamide DB766: azole interactions and role of CYP5122A1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 58(8):4682-9. doi: 10.1128/AAC.02405-14.

Pecoul B, Batista C, Stobbaerts E, Ribeiro I, Vilasanjuan R, Gascon J, Pinazo MJ, Moriana S, Gold S, Pereiro A, Navarro M, Torrico F, Bottazzi MF, Hotez PJ. The BENEFIT Trial: Where Do We Go from Here? *PLoS Negl Trop Dis* 2016 10(2): e0004343. doi:10.1371/journal.pntd.0004343.

Pereira-Chioccola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, Ferguson MA, Souto-Padron T, *et al.* Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. *J Cell Sci* 2000; 113: 1299–1307.

Piacenza L, Peluffo G, Radi R. L-arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001; 98(13), 7301-7306.

Pui C-H, Evans WE. A 50-Year Journey to Cure Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in hematology*. 2013;50(3):185-196. doi:10.1053/j.seminhematol.2013.06.007.

Pullan RL, Smith JL, Jasrasaria R, Brooker S. Global numbers of infection and diseaseburden of soil transmitted helminth infections in2010. *Parasit Vectors* 2014 7: 37.

Rassi A &Marin-Neto JA. Posaconazole versus benznidazole for chronic Chagas' disease. *New England Journal of Medicine*2014;371(10):965. DOI: 10.1056/NEJMc1407914#SA1.

Rogers KE, Keränen H, Durrant JD, et al. Novel Cruzain Inhibitors for the Treatment of Chagas' Disease. *Chemical Biology & Drug Design* 2012; 80(3):398-405. doi:10.1111/j.1747-0285.2012.01416.x.

Rosypal AC, Werbovets KA, Salem M, Stephens CE, Kumar A, Boykin DW, Hall JE, & Tidwell RR. Inhibition by dications of *in vitro* growth of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: causative agents of old world cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol* 2008;94:743–749.

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, Degraeve W, Andrade ZA. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2010; 105:233–238. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762010000200022>.

Sacconnay L, Angleviel M, Randazzo GM, et al. Computational Studies on Sirtuins from *Trypanosoma cruzi*: Structures, Conformations and Interactions with Phytochemicals. Setzer WN, ed. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8(2):e2689. doi:10.1371/journal.pntd.0002689.

Salomão, K., de Souza, E. M., Carvalho, S. A., da Silva, E. F., Fraga, C. A. M., Barbosa, H. S., & de Castro, S. L. (2010). *In vitro* and *in vivo* activities of 1,3,4-thiadiazole-2-arylhydrazones derivatives of megalin against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54(5), 2023–2031. <http://doi.org/10.1128/AAC>.

Schorer M, Debache K, Barna F, Monney T, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A. Di-cationicarylimidamides act against *Neospora caninum* tachyzoites by interference in membrane structure and nucleolar integrity and are active against challenge infection in mice. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2012; 2:109–120. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.03.001.

Schomburg KT, Rarey M. What is the potential of structure-based target prediction methods? *Future Med Chem* 2016; 6: 1987–1989.

Sebti SM, Adjei AA. Farnesyltransferase inhibitors. *Semin Oncol*. 2004; 31(1 Suppl 1):28-39.

Shelley JC, Cholletti A, Frye LL, Greenwood JR, Timlin MR, et al. Epik: a software program for pK_a prediction and protonation state generation for drug-like molecules. *J Comput Aided Mol Des* 2007; 21: 681–691.

Shen J, Cheng F, Xu Y, Li W, Tang Y. Estimation of ADME properties with substructure pattern recognition. *J Chem Inf Model* 2010; 50: 1034–1041.

Silva, CF & Boykin, DW. Diamidine activity against trypanosomes: the state of the art. *Current Molecular Pharmacology* 2008;1,151–161.

Soeiro MNC, De Souza EM. Programmed cell death & trypanosomatids: A brief review. In: Pérez Martin JM, ed. *Programmed Cell Death: From Protozoan Diseases to Human Cancers*, Landes Bioscience, 2007:1-15.

Soeiro MN, de Castro SL. *Trypanosoma cruzi* targets for new chemotherapeutic approaches. *Expert Opin Ther Targets* 2009; 13:105–21.

Soeiro MNC, Daliry A, Silva CF, de Souza M, Oliveira E GG, Salomão K, Menna Barreto R, Castro SL. 2010. Electron microscopy approaches for the investigation of the cellular targets of trypanocidal agents in *Trypanosoma cruzi*. p 191–203 In Méndez-Vilas A, Díaz J, editors. (ed), Microscopy: science, technology, applications and education, vol 1 Formatex Research Center, Badajoz, Spain.

Soeiro MN, Werbovetz K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology* 2013a; 140(8):929-51. doi: 10.1017/S0031182013000292.

Soeiro MNC, de Souza EM, da Silva CF, *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* 2013b; 57(9):4151-4163. doi:10.1128/AAC.00070-13.

Song J, Baker N, Rothert M, Henke B, Jeacock L, *et al.* Pentamidine is not a permeant but a nanomolar inhibitor of the *Trypanosoma brucei* aquaglyceroporin-2. *PLOS Pathog* 2016; 12: e1005436.

Teston AP, Monteiro WM, Reis D, Bossolani GD, Gomes ML, de Araújo SM, Bahia MT, Barbosa MG, Toledo MJ. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. *Trop Med Int Health*. 2013; 18(1):85-95. doi: 10.1111/tmi.12014.

Tidwell RR & Boykin DW. Dicationic DNA minor groovebinders as antimicrobial agents. In *Small Molecule DNA and RNA Binders: From Synthesis to Nucleic Acid Complexes* (ed. Demeunynck, M., Bailly, C. and Wilson, W. D.), 2003; (2):414–460. Wiley-VCH, New York, USA.

Timm, BL, Bernardino Da Silva, P, Batista, MM, Guedes Da Silva, FH, Da Silva, CF, Tidwell, RR, Patrick, DA, Kilgore Jones, S, Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro, MN. *In vitro* and *in vivo* biological effect of novel arylimidamide derivatives

against *Trypanosoma Cruzi*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy* 2014; 58, P. 3720-3726.

Trinconi CT, Reimão JQ, Coelho AC, Uliana SR. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. 2016; 71(5):1314-22. *J Antimicrob Chemother* doi: 10.1093/jac/dkv495.

Urbina, JA. Recent Clinical Trials for the Etiological Treatment of Chronic Chagas Disease: Advances, Challenges and Perspectives. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2015; 62: 149–156. doi: 10.1111/jeu.12184.

van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov* 2003; 2: 192–204.

Vanrell MC, Cueto JA, Barclay JJ, Carrillo C, Colombo MI, Gottlieb RA, & Romano PS. Polyamine depletion inhibits the autophagic response modulating *Trypanosoma cruzi* infectivity. *Autophagy*, 2013; 9(7), 1080–1093. <http://doi.org/10.4161/auto.24709>

Veiga-Santos P, Barrias ES, Santos JFC, De Barros Moreira TL, De Carvalho TMU, Urbina JA., De Souza W. Effects of amiodarone and posaconazole on the growth and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2012; 40 (1) , pp. 61-71.

Wadood A, Ahmed N, Shah L, Ahmad A, Hassan H, Shams S. In-silico drug design: An approach which revolutionarised the drug discovery process. *O A Drug Design & Delivery* 2013; 01;1(1):3.

Wale N, Karypis G. Target Fishing for Chemical Compounds using Target-Ligand Activity data and Ranking based Methods. *Journal of chemical information and modeling*. 2009; 49(10):2190-2201. doi:10.1021/ci9000376.

Wang MZ, Zhu X, Srivastava A, Liu Q, Sweat JM, Pandharkar T, Stephens CE, Riccio E, Parman T, Munde M, Mandal S, Madhubala R, Tidwell RR, Wilson WD,

Boykin DW, Hall JE, Kyle DE, and Werbovetz KA. Novel arylimidamides for the treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010. 54(6):2507-16. doi:10.1128/AAC.00250-10.

Werbovetz KA. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Current Opinion in Investigational Drugs* 2006; 7, 147–157.

Werbovetz, K; Riccio, E; Furimsky, A; Richard, J; He, S; Iyer, L; Mirsalis, J. Evaluation of antitrypanosomal dihydroquinolines for hepatotoxicity, mutagenicity, and methemoglobin formation *in vitro*. *International Journal of Toxicology* 2014; 12;33(4):282-287. PMID: 24819520.

Wilson WD, Tanious FA, Mathis A, Tevis D, Hall JE, Boykin DW. Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie*, 2008; 90(7): 999-1014.

WHO. Organização Mundial de Saúde. Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010. Geneva: WHO; 2010a. 6 February 2015, vol. 90, 6 (pp. 33–44).

WHO. Organização Mundial de Saúde. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2010b.

WHO. Organização Mundial de Saúde. Chagas disease: control and elimination. 2010c. Disponível em: http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf. Acessado em: 17/01/2017.

WHO. Organização Mundial de Saúde. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Geneva: WHO; 2013.

Yokoyama K, Lin Y, Stuart KD, Gelb MH. Prenylation of proteins in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 1997;87:61 _/9.

Yokoyama, K, Trobridge, P, Buckner, FS, Scholten, J, Stuart, KD, Van Voorhis, WC, and Gelb, MH. The effects of protein farnesyltransferase inhibitors on trypanosomatids: inhibition of protein farnesylation and cell growth. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1998; 94, 87–97

Yuan H, Quintana J, Dickerson RE. Alternative structures for alternating poly(dA-dT) tracts: the structure of the B-DNA decamer C-G-A-T-A-T-A-T-C-G. *Biochemistry* 1992; 31: 8009–8021.

Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG 2009. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1051-1054.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, Schijman AG, Llewelly MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR 2012. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol* 12: 240-253.

Zingales B, Araujo RGA, Moreno M, et al. A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2015;110(3):433-444. doi:10.1590/0074-02760140407.

Zhu X, Liu Q, Yang S, Parman T, Green C, Mirsalis J, Soeiro MN, de Souza EM, Batista CF, Batista DGJ, Stephens CE, Banerjee M, Abdelbasset Farahat AA, Munde M, Wilson WD, Boykin DW, Wang, MZ, Werbovetz, K. Evaluation of arylimidamides DB1955 and DB1960 as candidates against visceral Leishmaniasis and Chagas Disease— *in vivo* efficacy, acute toxicity, pharmacokinetics and toxicology studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56, 3690–3699.

8. ANEXOS

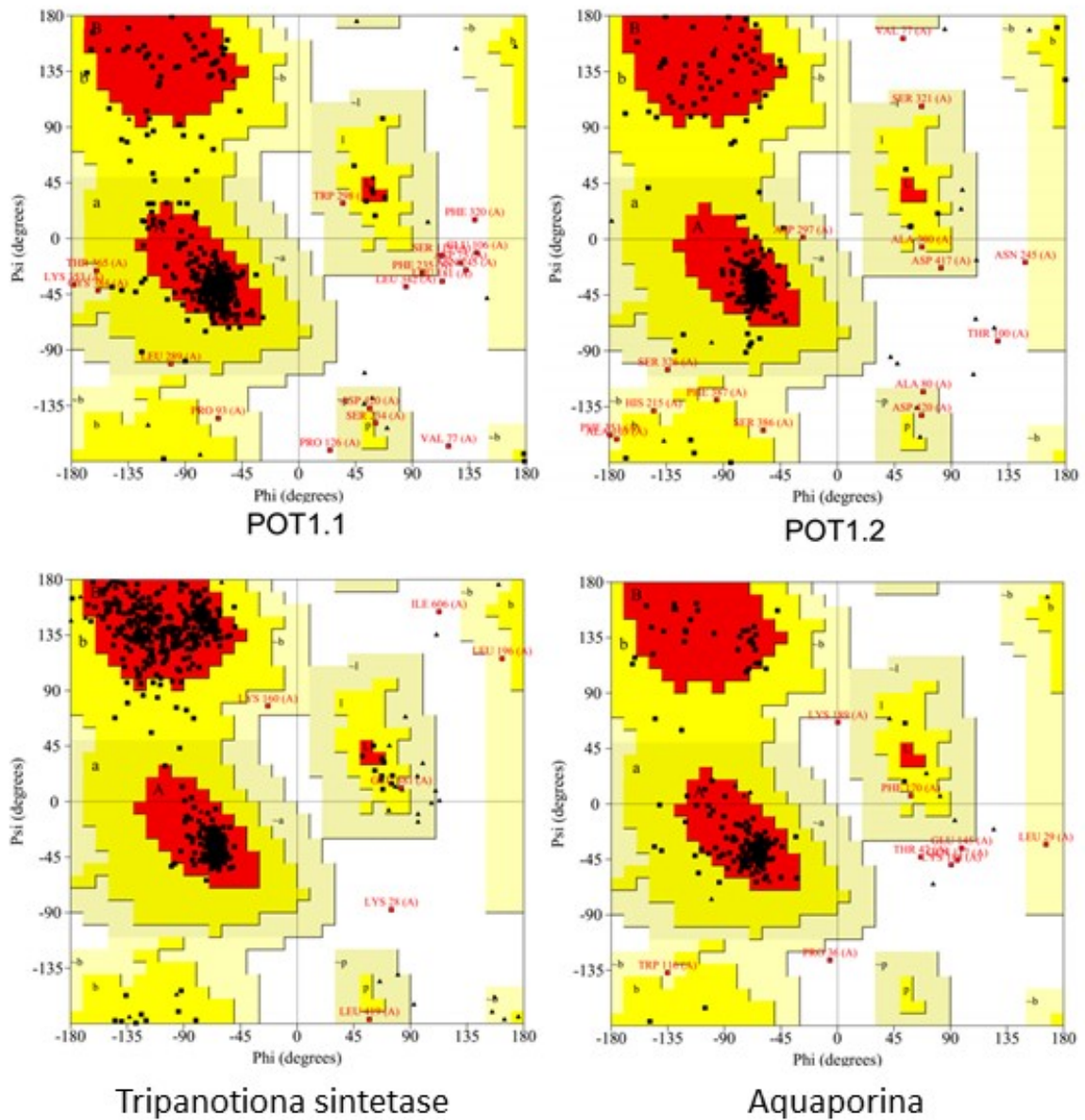


Figura S1. Gráficos de Ramachandran para alguns candidatos de *T. cruzi* obtidos por PROCHECK, mostrando os ângulos diédricos Psi e Phi de resíduos de aminoácidos. O vermelho representa as regiões mais favorecidas; amarelo representa regiões permitidas adicionais; bege representa regiões generosamente permitidas; e áreas brancas são regiões não permitidas.

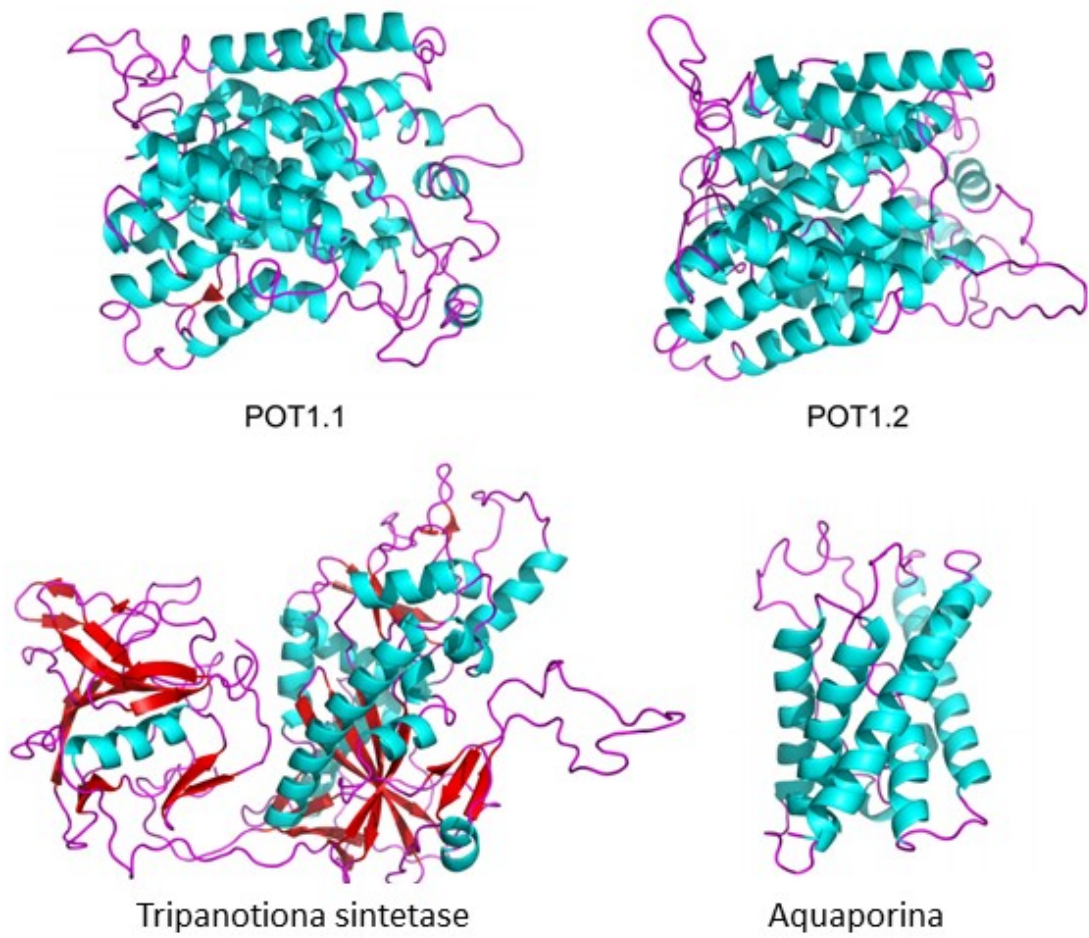


Figura S2. Estruturas 3D dos modelos de homologia selecionados (proteínas minimizadas) desenvolvidas com o servidor SWISS-MODEL.

Tabela S1. Detalhes dos candidatos-alvo do *T. cruzi* e informações do grid no estudo de *target fishing*.

Candidatos-alvo (UniProt ID)	Fonte	PDB ID (Resolução)	Informação do Grid	
			Dimensões (x, y, z)	Ligantes com comprimento ≤
Pirofosfatase Acidocalcissomal (Q4JH30)	PDB	5CUU (2.96 Å)	-16.69 x 37.22 x -12.42	22 Å
Aquaporina (Q8MXA3)	Pesquisa bibliográfica	Modelo de homologia	1.17 x 32.49 x -2.86	20 Å
Arginina quinase (O96507)	PDB	2J1Q (1.90 Å)	58.88 x 32.00 x 62.50	20 Å
Cruzaina (P25779)	PDB	3KKU (1.28 Å)	-4.49 x -33.45 x 3.63	18 Å
Ciclofilina (Q4DPB9)	PDB	1XQ7 (2.07 Å)	46.46 x 40.68 x 9.16	20 Å
Ácido desoxirribonucléico	Pesquisa bibliográfica	1PRP (2.10 Å)	10.11 x 22.79 x 8.68	24 Å
Dihidrofolato redutase-Timidilato sintase (Q8T5T8)	PDB	3KJS (2.50 Å)	17.06 x -31.51 x 42.85	19 Å
Dihidroorotato desidrogenase (Q4D3W2)	PDB	3W88 (1.40 Å)	3.94 x -14.72 x -11.54	17 Å
Farnesil difosfato sintase (Q95WL3)	PDB	4DWG (2.01 Å)	11.80 x 19.87 x 174.00	18 Å
Farnesiltransferase (Q4CWB4)	PDB	3WSB (2.40 Å)	-33.58 x 48.96 x -43.49	20 Å
Glucoquinase (Q4E4E1)	PDB	5BRH (1.90 Å)	19.81 x -10.75 x 61.82	20 Å
Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (P22513)	PDB	1K3T (1.95 Å)	26.92 x 10.15 x 8.24	22 Å
Glicose-6-fosfato isomerase (Q4E5N1)	PDB	4QFH (1.80 Å)	24.82 x 57.35 x 12.14	20 Å
Histidil-tRNA sintetase (Q4DA54)	PDB	4YRC (2.10 Å)	64.39 x 8.09 x 19.17	20 Å
Hipoxantina fosforibosil transferase (Q4DRC4)	PDB	1P19 (2.30 Å)	72.55 x 40.24 x 32.19	17 Å
Fosfodiesterase (Q53I60)	PDB	3V94 (2.33 Å)	-37.77 x -26.95 x -18.36	20 Å
POT1.1 (B2CQQ7)	Pesquisa bibliográfica	Modelo de homologia	39.81 x -3.53 x 31.66	24 Å
POT1.2 (Q4D143)	Pesquisa bibliográfica	Modelo de homologia	2.10 x 7.97 x 19.14	24 Å

Prostaglandina F2a sintase (Q8I6L9)	PDB	3ATZ (2.04 Å)	26.43 x 84.18 x 140.19	18 Å
Pteridina redutase 2 (Q8I814)	PDB	1MXF (2.30 Å)	17.36 x 52.13 x 24.71	22 Å
Piruvato quinase (Q4D9Z4)	PDB	4KS0 (2.80 Å)	16.59 x 8.55 x 30.06	22 Å
Ribose 5-fosfato isomerase tipo B (Q4CQE2)	PDB	3K7S (1.90 Å)	35.27 x 23.46 x 11.47	20 Å
Espermidina sintase (Q4DA73)	Pesquisa bibliográfica	4YUY (1.58 Å)	3.33 x 9.23 x 45.33	22 Å
Esterol 14-alfa demetilase (Q7Z1V1)	PDB	4C27 (1.95 Å)	-7.02 x 11.01 x -18.21	17 Å
Superoxido dismutase (Q4DCQ3)	PDB	4DVH (2.23 Å)	18.80 x -4.57 x 19.54	20 Å
Trans-sialidase (Q26964)	PDB	3B69 (1.67 Å)	7.02 x -18.82 x -6.13	18 Å
Triosefosfato isomerase (P52270)	PDB	1SUX (2.00 Å)	28.50 x 96.56 x 62.12	19 Å
Tripanotiona redutase (K4E0T9)	Pesquisa bibliográfica	4NEW (2.80 Å)	93.11 x -19.35 x -118.80	17 Å
Tripanotiona sintetase (Q9GT49)	Pesquisa bibliográfica	Modelo de homologia	-35.24 x -1.01 x 11.46	20 Å
UDP-Galactopiranoase mutase (Q4E1W2)	PDB	4DSG (2.25 Å)	70.18 x -15.83 x -29.06	20 Å