

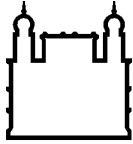
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NOVOS  
COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE INFECÇÃO POR *Trypanosoma*  
*cruzi*

JULIANNA SICILIANO DE ARAÚJO

Rio de Janeiro  
Dezembro de 2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

***JULIANNA SICILIANO DE ARAÚJO***

Ensaio biológico *in vitro* e *in vivo* de novos compostos sintéticos sobre infecção por *Trypanosoma cruzi*

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

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro

**RIO DE JANEIRO**  
Dezembro de 2015

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

A663 Araújo, Julianna Siciliano de

Ensaio biológico *in vitro* e *in vivo* de novos compostos sintéticos sobre infecção por *Trypanosoma cruzi* / Julianna Siciliano de Araújo. – Rio de Janeiro, 2015.

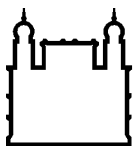
xiv, 89 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2015.

Bibliografia: f. 73-82

1. Doença de Chagas. 2. Quimioterapia experimental. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Arilimidamidas. 5. Inibidores de fosfodiesterase. I. Título.

CDD 616.9363



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

**AUTORA: JULIANNA SICILIANO DE ARAÚJO**

### ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*

**ORIENTADORA: Profa. Dra. Maria de Nazaré Correia Soeiro**

**Aprovada em: 21 / 12 / 2015**

#### **EXAMINADORES:**

<b>Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral - Presidente</b>	(IOC/Fiocruz)
<b>Prof. Dr. Juliany Cola Rodrigues</b>	(Biofísica/UFRJ)
<b>Prof. Dr. Constança Felícia de Paoli de Carvalho Britto</b>	(IOC/Fiocruz)
<b>Prof. Dr. Sérgio Henrique Seabra</b>	(UEZO)
<b>Prof. Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos</b>	(IOC/Fiocruz)

Rio de Janeiro, 21 de Dezembro de 2015

**Dedico este trabalho aos quase oito milhões de pacientes portadores de doença de Chagas que aguardam ansiosamente novas alternativas de tratamento mais seguras e acessíveis.**

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por permanecer abrindo tantas portas no meu caminho e por garantir que eu tivesse forças para cruzar cada uma delas.

À minha orientadora, Dra. Nazaré Soeiro, pela dedicação, carinho e paciência que demonstra desde a minha iniciação científica. O aprendizado e o crescimento que venho adquirindo na minha vida acadêmica são resultado, em grande parte, do seu empenho em nos transformar em profissionais cada dia mais comprometidos.

Aos técnicos Marcos Meuser e Patrícia Bernardino, pelo apoio nos experimentos e pela companhia no dia-a-dia.

Aos meus companheiros de bancada, Ana Cristina, Juliana M., Marcelle, Renan, Renata e Thabata, que dividem comigo essa rotina cansativa e gratificante, e aos pesquisadores Kelly Salomão, Solange L. de Castro e Rubem Menna-Barreto, pelos conselhos e sugestões.

Aos colegas mais recentes que se tornaram amigos tão queridos, Camila, João, Juliana C., Kelly D., Luane, Maria Alice, Raíza e Rayane.

Aos mais antigos e que me acompanham desde os primeiros passos na vida acadêmica, Aline, Beatriz, Carlos Fernando, Cristiane, Denise, Gabriel e Magna, e à Marianne, que, apesar de ter chegado depois, conquistou muito rápido meu carinho e confiança.

À Mariane e à Cristina, que foram de suma importância neste trabalho e deixaram lembranças muito boas e amizades valiosas.

Aos nossos colaboradores dos consórcios CPDD e PDE4NPD, que confiam no trabalho de excelência realizado no laboratório e na instituição, seja cedendo compostos que testamos, compartilhando conhecimento ou auxiliando em diferentes metodologias.

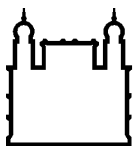
Às agências de fomento CAPES e FAPERJ, pelas bolsas de mestrado, à Fiocruz, ao CNPq e ao “European Union 7th Framework Program”, pelo apoio financeiro.

À minha mãe, Rosemary, que sempre foi o meu alicerce mais forte e a maior de todas as amigas. Ao meu pai, Edson, minha madrastra, Débora, meus irmãos, Gabriel e Artur, e minha cunhada, Camila, que viveram o dia-a-dia cansativo comigo e me deram suporte emocional para vencer mais esta etapa.

Aos amigos de todas as horas, Camila, Cíntia, Fernanda, Iury e Jessica, porque o que a UNIRIO uniu nem o tempo ou a distância separam.

**“O que quer que você faça, faça bem feito. Faça tão bem feito que, quando as pessoas te virem fazendo, elas queiram voltar e ver você fazer de novo.”**

**Walt Disney**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ENSAIOS BIOLÓGICOS *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS SOBRE INFECÇÃO POR *Trypanosoma cruzi*

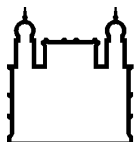
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Julianna Siciliano de Araújo

Dentre os protozoários causadores de doenças em humanos, destaca-se o *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (DC), descrita em 1909 por Carlos Chagas. Os fármacos atualmente disponíveis para o tratamento desta infecção, benzonidazol (BZ) e nifurtimox, mostram limitada eficácia na fase crônica tardia e estão associados a efeitos adversos graves, ressaltando a urgência no desenvolvimento de novas opções terapêuticas. Neste contexto, nosso grupo vem trabalhando em diferentes frentes na investigação de agentes com potencial antiparasitário. No presente trabalho, foi avaliado um total de 35 compostos, sendo 6 bis-arilimidamidas (AIAs) (DB1966, DB1967, DB1968, DB1979, DB1989 e DB1995), 9 mono-arilimidamidas (DB1996, DB1997, DB1980, DB2001, DB2002, DB2003, DB2004, DB2006 e DB2007) e 20 inibidores de fosfodiesterases (PDE) (VUF11848, VUF13522, VUF13526, VUF13527, VUF13536, VUF14256, VUF14656, VUF14703, VUF14767, VUF14768, VUF14852, VUF14907, VUF14975, VUFH1601, GBR11827, BS9538, IOTA0372, IGS1.1, IGS1.18, IGS5.51), comparando eficácia e segurança com BZ. Os resultados mostram que as AIAs dicatiônicas são significativamente mais ativas tanto sobre tripomastigotas sanguíneos como sobre amastigotas intracelulares do parasita quando comparadas aos compostos monocatiônicos, com valores de  $EC_{50}$  na faixa nanomolar (0.03 a 1  $\mu$ M). Todas as bis-AIAs exibiram atividade superior à do BZ, com destaque para DB1967 e DB1989 que, *in vivo*, foram capazes de reduzir significativamente os níveis de parasitemia, apesar de não alcançarem uma proteção contra a mortalidade comparável à do BZ. Já em relação aos inibidores de PDE, foi observada uma atividade diferencial a depender da forma evolutiva estudada, sendo os tripomastigotas menos sensíveis do que as formas intracelulares. GBR11827 se destaca por ser a mais ativa sobre a forma sanguínea e a de ação mais rápida (6 h) e com caráter irreversível, enquanto VUF13527 mantém perfil semelhante de atividade sobre as distintas cepas estudadas (Y, Tulahuen e Colombiana) exibindo  $EC_{50}$  entre 0,1 e 0,5  $\mu$ M. A atividade sobre amastigotas axênicas e a análise de tratamento das células hospedeiras antes da infecção pelo parasito descartaram ação moduladora dos inibidores sobre a célula hospedeira. O conjunto dos dados contribui para o desenvolvimento racional e otimização de novas moléculas destas classes, com o objetivo de identificar novas alternativas para o tratamento da DC.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### *IN VITRO* AND *IN VIVO* BIOLOGICAL ASSESSMENT OF NEW SYNTHETIC COMPOUNDS UPON *Trypanosoma cruzi* INFECTION

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Julianna Siciliano de Araújo

Among the protozoan parasites that cause human diseases, *Trypanosoma cruzi* stands out as the etiologic agent of Chagas' disease (CD), described in 1909 by Carlos Chagas. Drugs currently available for the treatment of this infection, benznidazole (BZ) and nifurtimox, show limited efficacy and are associated with serious adverse effects, highlighting the urgent need of developing new therapeutic options. In this context, our group has been working on different fronts in the investigation of agents with antiparasitic potential. In this study, a total of 35 compounds was established: 6-arylimidamides (AIAs) (DB1966, DB1967, DB1968, DB1979, DB1989 and DB1995), 9 mono-arylimidamides (DB1996, DB1997, DB1980, DB2001, DB2002, DB2003, DB2004, DB2006 and DB2007) and 20 phosphodiesterases inhibitors (VUF11848, VUF13522, VUF13526, VUF13527, VUF13536, VUF14256, VUF14656, VUF14703, VUF14767, VUF14768, VUF14852, VUF14907, VUF14975, VUFH1601, GBR11827, BS9538, IOTA0372, IGS1.1, IGS1.18, IGS5.51), comparing to the data using BZ as reference drug. The results show that dicationic AIAs are significantly more active upon both bloodstream trypomastigotes and intracellular amastigotes compared to the monocationic ones, with nanomolar EC<sub>50</sub> values (0.03 up to 1 µM). All bis-AIAs exhibited superior activity than BZ, especially DB1967 and DB1989 that, *in vivo*, were able to significantly reduce parasitemia levels in spite of not reaching protection against mortality comparable to BZ. For the PDE inhibitors, differential activity was observed depending on the evolutionary form assayed, with bloodstream trypomastigotes being less sensitive than intracellular forms. GBR11827 stands out for being the most active on bloodstream forms, for presenting the fastest action (6 h) and acting irreversibly. VUF13527 maintains similar profile of activity upon Y, Tulahuen and Colombian strains of *T. cruzi* (EC<sub>50</sub> ranging 0.1 and 0.5 µM). The activity on axenic amastigotes and the previous treatment of the host cells with the compounds were also assessed and a potential modulating effect on the mammalian cell was discarded. Thus, this work contributes to the rational development of new molecules and even optimization of these molecules, aiming to identify new alternatives for CD treatment.

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>x</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Doença de Chagas</b> .....	<b>15</b>
1.1.1 O parasito.....	15
1.1.2 Epidemiologia.....	17
1.1.3 Manifestações clínicas.....	19
1.1.4 Tratamento.....	20
<b>1.2 Quimioterapia experimental</b> .....	<b>21</b>
1.2.1 Arilimidamidas.....	24
1.2.2 Inibidores de fosfodiesterases.....	26
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>30</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>30</b>
<b>3 ARTIGOS</b>	<b>31</b>
<b>3.1 Artigo I</b> .....	<b>31</b>
<b>3.2 Artigo II</b> .....	<b>39</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>62</b>
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>71</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>73</b>
<b>7 ANEXOS</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema ilustrando o ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> (Fonte: adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention).....	16
Figura 2	Distribuição da doença de Chagas na Europa (Fonte: adaptado de OMS, 2009).....	19
Figura 3	Benzonidazol (A) e Nifurtimox (B), fármacos de escolha para o tratamento etiológico da doença de Chagas.....	20
Figura 4	Estruturas da arilimidamida DB766 (A) e da diamidina aromática DB75 (B). Enquanto um átomo de nitrogênio (setas vermelhas) conecta a amidina à estrutura aromática central em (A), esta função é cumprida por um átomo de carbono (setas azuis) em (B) (Fonte: adaptado de De Souza et al., 2004 e Batista et al., 2010a).....	25
Figura 5	Estrutura química do sildenafil e do seu análogo WYQ16. Pequenas alterações estruturais resultam em modificações significativas na atividade dos inibidores sobre a isoforma PDEC de <i>Trypanosoma cruzi</i> (Fonte: adaptado de Woodring & Pollastri, 2014).....	27

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil de produto alvo para a pesquisa de compostos para a doença de Chagas (Fonte: adaptado de Ribeiro et al. 2009).....	23
Tabela 2	Critérios e parâmetros utilizados na definição e seleção de compostos “Hit” e “Lead” (Fonte: adaptado de Don & loset, 2013).....	62

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIA	Arilimidamida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Adenina/Timina
BZ	Benzonidazol
CDC	Do inglês “Center for Disease Control and Prevention”
CVC	Complexo do vacúolo contrátil
DA	Diamidina aromática
DC	Doença de Chagas
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Do inglês “deoxyribonucleic acid”
DND <i>i</i>	Do inglês “Drugs for Neglected Diseases Initiative”
DTN	Doença tropical negligenciada
DTU	Do inglês “discrete typing unit”
EC <sub>50</sub>	Do inglês “50% effective concentration”
hs	Horas
HTS	Do inglês “high throughput screening”
IS	Índice de seletividade
kDNA	Cinetoplasto
LAFEPE	Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco
PDE	Fosfodiesterase
PPP	Parcerias público-privadas
OECD	Do inglês “Organisation for Economic Co-operation and Development”
OMS	Organização Mundial da Saúde
TPP	Do inglês “Target Product Profile”

# 1 INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de um bilhão de pessoas, aproximadamente um sétimo da população mundial, sofra de alguma doença tropical negligenciada (DTN), um grupo de dezessete patologias assim agrupadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) devido à carência de investimentos financeiros para pesquisa e desenvolvimento de novas drogas por parte das indústrias farmacêuticas e à negligência por parte do poder público em relação a medidas de controle e acesso a diagnóstico e terapias disponíveis (Mackey et al., 2014; OMS, 2015). Dentre elas, está a doença de Chagas (DC), descrita em 1909 pelo médico sanitarista e pesquisador brasileiro Carlos Chagas a partir de achados obtidos na cidade de Lassance, em Minas Gerais (Chagas, 1909). Causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, a DC figura entre as principais causas de cardiopatia infecciosa em todo o mundo, em especial nas áreas endêmicas de 21 países da América Latina, onde é responsável por mais mortes do que qualquer outra doença parasitária (Chatelain, 2015; OMS, 2015; DNDi, 2015).

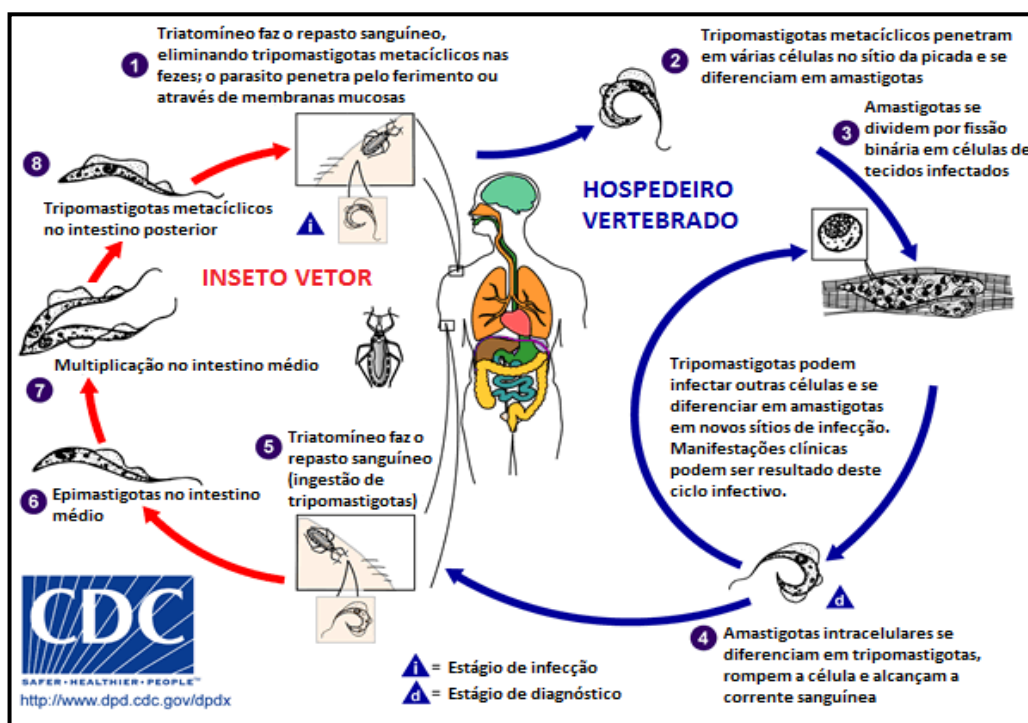
## 1.1 Doença de Chagas

Somente na América Latina, estima-se que aproximadamente 8 milhões de indivíduos estejam infectados, 28 milhões estejam sob risco de evoluir para a forma crônica, sendo cerca de 10 mil mortes associadas à DC todos os anos (OMS, 2015; Pérez-Molina et al., 2015).

### 1.1.1 O parasito

O *T. cruzi* é um protozoário pertencente ao filo Sarcomastigophora, subfilo Mastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Rassi Jr. et al., 2012). Capaz de infectar mais de 150 espécies de mamíferos, incluindo seres humanos, animais domésticos e silvestres, o ciclo de transmissão normalmente inclui um vetor infectado, um inseto hematófago conhecido popularmente como barbeiro, pertencente ao filo Arthropoda, subfilo Hexapoda, ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Coura, 2015).

O ciclo de vida (**Figura 1**) envolve o repasto sanguíneo de um triatomíneo num indivíduo infectado, através do qual o inseto ingere as formas tripomastigotas sanguíneas. Uma vez no intestino médio, tripomastigotas se diferenciam para as formas epimastigotas, que se multiplicam; na extremidade posterior do trato digestório, e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, num processo denominado metaciclogênese, sendo estas formas eliminadas nas fezes e na urina do inseto. Ao se alimentar novamente, o triatomíneo libera as formas infectantes, introduzidos mecanicamente pelo ato de coçar o local da picada ou diretamente em áreas de mucosa. No hospedeiro vertebrado, o parasito, inicialmente, infecta células localizadas no sítio de invasão e no meio intracelular, estas formas tripomastigotas passam por mudanças morfológicas e bioquímicas, resultando na sua diferenciação em amastigotas, que se replicam por divisão binária. A seguir, diferenciam-se novamente em tripomastigotas e rompem a membrana plasmática da célula hospedeira, podendo infectar células vizinhas e de sítios mais distantes (difundidos através dos sistemas sanguíneo e linfático), ou, ser novamente ingeridas pelo inseto vetor através do repasto sanguíneo, completando o ciclo (Brener & Chiari, 1963).



**Figura 1** Esquema ilustrando o ciclo de vida do *T. cruzi*. (Fonte: adaptado de CDC – Centers for Disease Control and Prevention; disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

Um dos primeiros eucariontes divergentes, *T. cruzi* é um parasito unicelular que passa por fases de diferenciação em dois hospedeiros diferentes (Ameisen et

al., 1995), o que exige a presença de, além das organelas comuns aos eucariontes, outras que lhe são próprias e que permitem sua sobrevivência nestes ambientes variados (De Souza et al., 2010). A identificação dos diferentes estágios do parasito pode ser realizada por análise por microscopia de luz avaliando i) o formato do corpo; ii) a posição do flagelo em relação ao cinetoplasto e ao núcleo, iii) a localização da bolsa flagelar e iv) a emergência e extensão do flagelo. Como representante da ordem Kinetoplastida, *T. cruzi* apresenta uma estrutura rica em DNA na sua mitocôndria única e ramificada, o cinetoplasto, com morfologia variável de acordo com o estágio evolutivo, apresentando-se arredondado em tripomastigotas e na forma de bastão ou cesta em epimastigotas e amastigotas (De Souza, 1984).

Durante seu ciclo, *T. cruzi* enfrenta inúmeras variações na temperatura, no teor de glicose, na osmolaridade e no pH do ambiente extracelular. A regulação fina destas duas últimas características, essencial para sobrevivência e *fitness* do parasito, está relacionada, em especial, a duas estruturas: i) os acidocalcisomos, sítios de estoque de íons, apresentando altas concentrações de fósforo, magnésio, cálcio, sódio e zinco, além de canais iônicos e transportadores na membrana (Docampo & Moreno, 2008; Benaim & Garcia, 2011); e ii) o complexo do vacúolo contrátil (CVC), formado por um vacúolo central conectado a um conjunto de túbulos e vesícula denominado espongioma (Niyogi et al., 2014). Importante destacar a interligação entre estas duas estruturas no equilíbrio osmótico do parasito.

### **1.1.2 Epidemiologia**

A DC é uma patologia de relevância socioeconômica e cultural na América Latina, afetando majoritariamente populações carentes, de áreas rurais e, frequentemente, esquecidas. De acordo com a severidade, natureza da infecção, ciclos de transmissão, prevalência e programas de controle, quatro principais grupos de países podem ser identificados: i) Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Equador, Paraguai, Peru, Uruguai e Venezuela, onde a DC é caracterizada pela existência de ciclos domiciliares, peridomiciliares e silvestres, com zonas de alta prevalência de infecção humana, presença de miocardiopatia e anormalidades digestivas (com exceção da Venezuela) e controle de transmissão em bancos de sangue e vetorial melhor estabelecido (com exceção da Bolívia); ii) Colômbia, Costa Rica, Equador, El

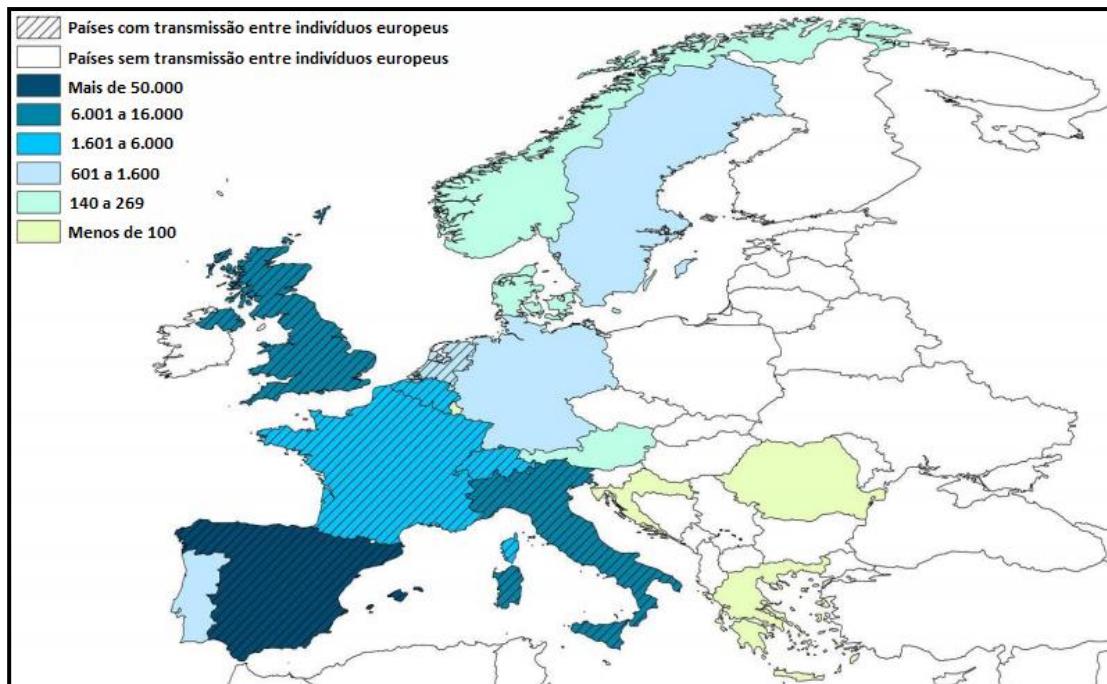


Salvador, Guatemala, Honduras, Nicarágua e Panamá, onde os ciclos são similares aos do grupo anterior, contudo não são observadas anormalidades digestivas e o controle vetorial e de bancos de sangue existe mas é mais recentes; iii) Belize, Guiana Francesa, Guiana, Suriname, México e Estados Unidos, onde o ciclo é primariamente silvestre, as informações a respeito das manifestações clínicas são limitadas e o controle vetorial e transfusional está em fase inicial e iv) países não endêmicos (Coura & Albajar Viñas, 2010), descritos abaixo.

Na transmissão vetorial clássica, triatomíneos silvestres progressivamente ganham acesso e domiciliam casas de barro e pau-a-pique, nas quais habitam rachaduras nas paredes e telhados. Algumas dessas habitações podem abrigar até 14.000 insetos, permitindo a manutenção da transmissão vetorial (Coura & Albajar Viñas, 2010). Significativos focos de infestação ainda podem ser encontrados, especialmente em algumas áreas da Bolívia, que tem a maior taxa de prevalência de infecção humana (Coura, 2015). Na última década, segundo dados da Secretaria de Vigilância Sanitária, o caráter epidemiológico da DC no Brasil mudou, com a transmissão vetorial por via oral emergindo como a principal forma de transmissão (> 70%) na região Amazônica e em outras regiões do país, em especial decorrente do controle químico de domiciliação do vetor *Triatoma infestans* em resposta a ações de programas nacionais e internacionais (Shikanai-Yasuda & Carvalho, 2012; Bonney, 2014).

Apesar de a via vetorial ser a forma mais comum de transmissão, a DC pode atingir o homem através de outros mecanismos (Rassi Jr et al., 2012). Em países onde não há controle universal dos centros de hemoterapia e dos órgãos transplantados, essa via pode ser responsável por cerca de 20% dos casos de infecção (Coura & Dias, 2009), em especial em regiões não endêmicas. Com o aumento do fluxo migratório ao longo das últimas décadas, houve um crescimento correspondente no movimento de portadores crônicos da DC para países como Estados Unidos, Canadá, Japão, Austrália e da União Europeia, que não possuem na sua rotina laboratorial o diagnóstico de infecção por *T. cruzi* (Angheben et al., 2015). Na Europa (**Figura 2**), a via transfusional deve ser considerada como a principal fonte de potenciais infecções. Na França e na Espanha, a busca ativa de portadores se faz através da triagem de sangue e pela entrevista de seus doadores com potencial risco para DC, enquanto na Itália e no Reino Unido, as pessoas nativas de países endêmicos são excluídas do processo de doação. Nos outros países europeus, não há um processo comum para a triagem (Strasen et al., 2014).

Importante, ainda, mencionar que nos EUA há relatos de falhas na triagem sorológica em bancos de sangue por se dar em forma de amostragem, além de casos autóctones na área do Texas, onde um grande percentual de vetores está infectado (CDC 2015). Outra relevante forma de transmissão é a materno-fetal, tanto em áreas endêmicas (como Bolívia e Argentina) como em não endêmicas (Strasen et al., 2014).



**Figura 2** Distribuição da doença de Chagas na Europa (Fonte: adaptado de OMS, 2009)

### **1.1.3 Manifestações clínicas**

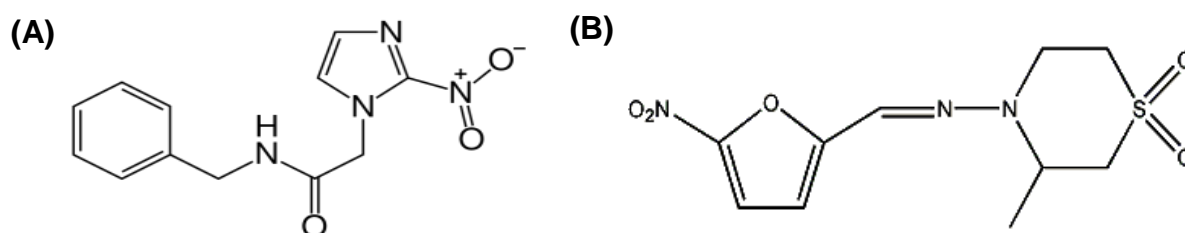
A doença de Chagas é uma condição complexa resultante da invasão e do estabelecimento bem-sucedido da interação entre *T. cruzi* e seus hospedeiros (no caso ser humano), ocorrendo em duas fases: aguda e crônica (Andrade & Andrade, 1968). Durante a fase aguda da doença, a maioria dos pacientes apresenta sintomas leves e autolimitados. Caso a inoculação do parasito ocorra próximo à conjuntiva, o indivíduo pode apresentar um inchaço unilateral, indolor e bipalpebral, conhecido como sinal de Romaña e que pode persistir por algumas semanas (Bern, 2011). Sintomas podem se desenvolver em períodos variáveis (ex. em torno de 8 a 10 dias após a invasão via vetorial clássica ou em 20 a 40 dias via transfusional) e incluem febre prolongada, mal-estar, aumento do fígado, baço e nódulos linfáticos, e

edema subcutâneo localizado ou generalizado. Em casos raros, pode ocorrer miocardite grave, sendo a maioria das mortes por doença de Chagas aguda devida à insuficiência cardíaca. Sinais neurológicos não são comuns, mas meningoencefalite ocorre ocasionalmente, especialmente em crianças menores de 2 anos (Rassi Jr et al., 2012).

A maioria dos pacientes permanece assintomática, mas entre 20 a 30% ocorrem as manifestações cardíacas, incluindo distúrbios de condução, aneurisma apical e insuficiência cardíaca, associados ou não a sinais gastrointestinais, que incluem megaesôfago e/ou megacólon. Com menor frequência, também podem ser observados sintomas neurológicos e um maior risco de acidente vascular cerebral tem sido associado à infecção. Crianças infectadas congenitamente são muitas vezes assintomáticas; alguns podem ter baixo peso ao nascer, baixos índices de Apgar, anemia, trombocitopenia e hepatoesplenomegalia. Raramente, miocardite ou meningoencefalite podem ocorrer em recém-nascidos com infecção congênita (Woodhall et al., 2014).

#### 1.1.4 Tratamento

Desenvolvidos há mais de 40 anos, Nifurtimox (NF) e Benzonidazol (BZ) (**Figura 3**) são os fármacos utilizados no tratamento etiológico da DC.



**Figura 3** Benzonidazol (A) e Nifurtimox (B), fármacos disponíveis para o tratamento etiológico da doença de Chagas.

O NF, lançado comercialmente em 1967, tem seu efeito tripanocida associado ao estresse oxidativo gerado pela transformação de um radical nitroaniônico (via nitrorredutase), por geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e por peroxidação lipídica. (Docampo & Stoppani, 1979; Moreno et al., 1984). No entanto, Boiani e colaboradores (2010) observaram uma redução nos níveis de tióis de baixo

peso molecular em parasitos tratados, sem correlação com a produção de EROs em concentrações terapêuticas (Boiani et al., 2010). Esta droga teve sua utilização suspensa no Brasil, na Argentina, no Chile e no Uruguai na década de 1980, tendo sua produção interrompida pela Bayer em 1997. Contudo, em 2000, a produção no complexo de Ilopango Bayer, em El Salvador, foi reiniciada para dar suporte ao tratamento da tripanossomíase africana através de combinação com a eflornitina (Coura & De Castro, 2002; Jannin & Villa, 2007; Eperon et al., 2014).

O BZ, por sua vez, foi lançado comercialmente em 1972 e tem como provável mecanismo de ação a inibição da síntese proteica e da cadeia respiratória. Alguns autores sugerem que o efeito tripanocida do BZ está relacionado a ligação de seus intermediários nitrorreduzidos (via NR) a vários componentes celulares, como DNA, proteínas e lipídeos (Diaz de Toranzo et al., 1988). Mais recentemente, foi caracterizada uma nitrorredutase tipo I insensível a oxigênio responsável pela ativação de BZ e NF no parasite, utilizando NADH como cofator (Wilkinson et al., 2008; Wilkinson & Kelly, 2009; Hall et al., 2011; Hall & Wilkinson, 2012). A empresa suíça Roche, fabricante mundial do BZ, iniciou o processo de transferência da tecnologia de fabricação do fármaco para o Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) em 2003, ficando este responsável pela produção no Brasil (Jannin & Villa, 2007). Em parceria com o DNDi (do inglês *Drugs for Neglected Diseases initiative*), o LAFEPE desenvolveu uma formulação pediátrica do fármaco, registrado na ANVISA em 2011 (Mackey et al., 2014). Até este mesmo ano, o princípio ativo utilizado foi aquele cedido pela Roche e, a partir daí a empresa Nortec Química assumiu a síntese. Contudo, devido à necessidade de nova acreditação em boas práticas de fabricação (BPF), o LAFEPE se viu obrigado a interromper a produção do BZ em agosto de 2011 e aguarda-se em breve sua retomada no mercado. Em janeiro do ano seguinte, o composto voltou a ser produzido pela ELEA/Mundo Sano, uma iniciativa público-privada argentina (MSF, 2015) incluindo também a formulação pediátrica (Pays, 2012).

Tanto o BZ como o NF geram efeitos colaterais significativos, incluindo hipersensibilidade cutânea, dermatites, intolerância digestiva, depressão da medula óssea, polineuropatia periférica, hepatotoxicidade, anorexia, perda de peso, sonolência ou excitabilidade (Viotti et al., 2009; Olmo et al., 2015). Além dos efeitos colaterais, eles requerem longos períodos de tratamento e, apesar de apresentar significativa eficácia na fase aguda da doença, na fase crônica, o índice de cura fica

entre 8 e 30% (Clayton, 2010). Existem, ainda, evidências de resistência natural de determinadas cepas a ambos os medicamentos (Murta et al., 1998; Hall et al., 2011).

Zingales (2012) discute que as dificuldades farmacológicas do tratamento da DC são resultantes da falta de novos estudos epidemiológicos e metodológicos relacionando as DTUs (do inglês “discrete typing units”) do *T. cruzi* às respectivas manifestações clínicas, o que, conseqüentemente, leva a impossibilidade de um consenso internacional quanto à escolha de um determinado medicamento para um grupo específico de pacientes (Zingales et al. 2012). Contudo, a aplicação do tratamento também deveria levar em consideração a localização geográfica, o estágio clínico da doença e a faixa etária do paciente (Jannin & Villa, 2007) embora o consenso atual seja que todos os casos agudos e crônicos recentes devem ser tratados e que os portadores sintomáticos o sejam, a depender de sua condição clínica a ser avaliada individualmente pelo médico, sugerindo-se ainda que sejam utilizadas doses menores por períodos mais longos evitando assim seu perfil de toxicidade (Rassi Jr et al., 2012).

## **1.2 Quimioterapia experimental**

Segundo recomendações da OMS, é preciso oferecer tratamento etiológico para os pacientes e toda infraestrutura necessária para tal, bem como estímulo à criação de um consenso entre os países afetados para definição precisa do melhor tratamento a ser aplicado e incentivo à pesquisa para identificação de melhores ferramentas para o desenvolvimento de drogas seguras e eficazes (OMS/TDR, 2012). Além disso, a OMS (assim como o consenso acadêmico e de instituições não governamentais, como DNDi) estabelece que o fármaco ideal para o tratamento da DC deve cumprir com vários requerimentos, incluindo: i) indução de cura parasitológica nas fases aguda e crônica; ii) eficácia em uma ou poucas doses ( $\leq 60$  dias); iii) apresentar baixo custo; iv) não ter efeitos colaterais graves/irreversíveis ou teratogênicos; e v) não induzir resistência (OMS, 2006). Já Buckner & Navabi (2010) ressaltam que, além de ativo e seguro, é essencial a baixa interação do composto-candidato com enzimas do complexo citocromo P450, evitando, desta forma, sinergismos ou antagonismos com outros fármacos, como antiarrítmicos e anticoagulantes.

A fim de definir prioridades no tocante à pesquisa de novas opções terapêuticas para a DC e traçar as necessidades mais imediatas dos pacientes, o DNDi apresentou um perfil de produto alvo (TPP, do inglês “Target Product Profile”). Atuando como um guia, o atual TPP contém elementos que descrevem o produto ideal para orientar o processo de desenvolvimento (**Tabela 1**) tendo por base os dados gerados nos ensaios clínicos recentes utilizando triazóis inibidores da CYP51. Além das características de eficácia e segurança superiores aos fármacos disponíveis o TPP inclui também tempo de tratamento  $\leq$  terapia com antifúngicos, estabilidade (3-5 anos em zona climática IV) e ação sobre todas as cepas de *T. cruzi* ou pelo menos sobre representantes das DTUs I, II, V e VI (Ribeiro et al., 2009; DNDi, 2015). Além do TPP para DC, há de se considerar os critérios mínimos de seleção de compostos promissores e líderes de modo a progredir no fluxograma de desenvolvimento de novos fármacos para esta patologia (Romanha et al., 2010; Don & Ioset, 2013) que inclui como características fundamentais a atividade  $\leq 1 \mu\text{M}$  e índice de seletividade (IS)  $\geq 50$  (para compostos líderes).

**Tabela 1:** Perfil de produto alvo para a pesquisa de compostos para a doença de Chagas (Fonte: adaptado de Ribeiro et al. 2009)

	<b>Aceitável</b>	<b>Ideal</b>
<b>Fase alvo</b>	Crônica recente/Indeterminada	Aceitável + Reativações
<b>Sub-espécies de <i>T. cruzi</i></b>	Tc I-VI	Tc I-VI
<b>Distribuição</b>	Todas as áreas	Todas as áreas
<b>População alvo</b>	Imunocompetentes	Aceitável + Imunossup.
<b>Adultos/Crianças</b>	Adultos	Todos
<b>Eficácia clínica</b>	$\geq$ BZ em áreas endêmicas	Aceitável + portadores reativados
<b>Resistência</b>	Ativo contra cepas resistentes ao BZ e ao NF	Ativo contra cepas resistentes ao BZ e ao NF
<b>Segurança</b>	$>$ BZ / 3 avaliações clínicas e dois testes laboratoriais padrões durante o tratamento	$>$ BZ / Sem necessidade de monitoramento durante o tratamento
<b>Contraindicações</b>	Gravidez/Lactação	Nenhuma
<b>Precauções</b>	Sem genotoxicidade/Não prolonga o intervalo QT	Sem genotoxicidade ou efeitos indesejados/Não prolonga o intervalo QT
<b>Interações</b>	Ausência com antiarrítmicos, anti-hipertensivos e anticoagulantes	Nenhuma
<b>Apresentação</b>	Oral	Oral
<b>Estabilidade</b>	3 anos em zona climática IV	5 anos em zona climática IV
<b>Regime de dosagem</b>	$\approx$ Antifúngicos	2x ao dia / 60 dias

O estabelecimento de parcerias público-privadas (PPP) que permitem a colaboração entre governos, setor privado, academia, organizações não-governamentais e órgãos regulamentadores tem sido uma tendência crescente (Goldman, 2012). Exemplos de sucesso incluem a iniciativa DNDi, focado no desenvolvimento de novas terapias para seis DTNs, e o programa TDR/WHO (do inglês "WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases"), criado para combate à filariose e cofinanciado pela UNICEF (do inglês "United Nations Children's Fund"), pelo Programa de Desenvolvimento das Nações Unidas, pelo Banco Mundial e pela OMS, em colaboração com as multinacionais farmacêuticas GlaxoSmithKline e Merck (Mackey et al., 2014).

A maioria das grandes empresas farmacêuticas está investindo num portfólio baseado em opções de baixo risco, que incluem, entre outros, indicações secundárias e o reposicionamento fármacos para DTNs que compartilhem alvos conservados (Persidis, 2012). Esta última estratégia oferece vantagens como um ciclo mais curto de desenvolvimento, custo reduzido e menor incerteza em relação à segurança e perfil farmacocinético. Diversas abordagens, como a triagem fenotípica, sistemas de *high throughput screening* (HTS) e análises *in silico* incluindo de modelagem molecular podem, isoladamente ou de modo colaborativo, ser adotadas para identificar novos usos para medicamentos descontinuados ou pertencentes a bibliotecas comerciais (Khanna et al., 2012).

Além de considerar a eficácia de um novo candidato, é necessária uma avaliação inicial, mesmo que preditiva, dos níveis de toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, uma vez que o mesmo pode levar a alterações nos processos celulares do paciente/hospedeiro, desencadeando efeitos indesejáveis (reversíveis ou irreversíveis) a curto, médio e longo prazo (Maron & Ames, 1983; Surh, 1999). Atualmente, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), apoiada em normativas da OECD (do inglês "Organisation for Economic Co-operation and Development"), recomenda dois conjuntos de metodologias que podem ser utilizadas na avaliação genotóxica de um novo fármaco: i) um teste de mutagenicidade em bactérias, dois testes citogenéticos, sendo um *in vitro* e outro *in vivo* utilizando células hematopoiéticas de roedores, visando avaliar dano cromossômico; ii) um teste para avaliar mutagenicidade em bactérias além de teste *ex vivo* utilizando células oriundas de dois tecidos distintos (OECD, 1997).

Com relação a novos fármacos para DC, vários estudos pré-clínicos têm sido conduzidos com diversas metodologias e diferentes classes de compostos (naturais e sintéticos) a partir de distintas abordagens. Estes estudos incluem o reposicionamento de medicamentos pela triagem em bibliotecas de compostos e /ou síntese de novos análogos e derivados de fármacos já utilizados na clínica médica para outras patologias e compartilhem alvos em comum ao *T. cruzi* (ex. inibidores de proteases como a cruzaina (McKerrow et al., 2009), inibidores de biossíntese de lipídeos (Urbina, 2009), inibidores de fosfodiesterases (PDE) (Woodring & Pollastri, 2014), análogos e derivados da amidina aromática pentamidina (Soeiro et al., 2013)). Assim, a seguir faremos uma breve revisão sobre duas classes que foram estudadas na presente dissertação, ambas com base no desenvolvimento racional de novos compostos candidatos.

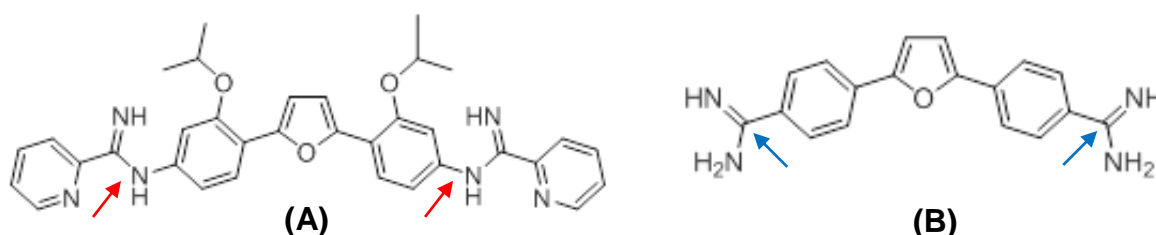
### **1.2.1 Arilimidamidas**

Uma classe vastamente investigada e que revela promissora atividade é a das diamidinas aromáticas (DAs), compostos que se associam de forma não-covalente e não-intercalante à fenda menor do DNA em regiões ricas em AT (Wilson et al., 2008). A observação da eficácia destes compostos sobre diferentes protozoários foi feita ainda na década de 1930, com a descoberta da pentamidina, um análogo da insulina, e, posteriormente, de outras DAs que se mostraram efetivas para doença do sono e leishmanioses (King et al., 1937; Ashley et al., 1942). Dados *in vitro* também têm demonstrado a relação entre a ação tripanocida destes compostos e algumas características estruturais, tais como: i) presença dos dois grupamentos catiônicos terminais, sendo as monoamidina menos efetivas e mais tóxicas que diamidinas (Pacheco et al., 2009); ii) linearidade ou não da molécula sendo as curvas mais ativas e seletivas sobre diferentes formas de *T. cruzi* (Batista et al., 2010b); iii) a natureza dos componentes dicatiônicos, mostrando, por exemplo, que grupos amino levam a um melhor efeito tripanocida em relação a diguanidinas (Silva et al., 2007a). Com relação aos alvos celulares desta classe de compostos, estudos bioquímicos, moleculares e funcionais têm sido realizados em diferentes patógenos e os dados apontam para a ação sobre DNA, mitocôndria, topoisomerasas, citoesqueleto e síntese de poliaminas, entre outros (Wilson et al., 2014). Em *T. cruzi* demonstramos através de ensaios termodinâmicos a falta de correlação entre



atividade de várias moléculas amidínicas e sua direta associação com o kDNA do parasito (Daliry et al., 2011).

Apesar da comprovada eficácia em estudos pré-clínicos, a baixa biodisponibilidade da maioria das DAs clássicas, atribuída ao alto pK do grupo funcional amidina, dificulta seu uso clínico (Soeiro et al., 2013). Visando transpor esta dificuldade, foram desenvolvidos derivados, anteriormente conhecidos como diamidinas reversas e hoje chamadas de arilimidamidas (AIAs), que têm revelado promissora ação em ensaios *in vitro* (Silva et al., 2007a,b; Pacheco et al., 2009; Timm et al., 2014) e *in vivo* (Mdachi et al., 2009; Batista et al., 2010a; Da Silva et al., 2012). As AIAs diferem estruturalmente dos outros análogos de DAs porque o grupo imino terminal está ligado ao anel arila através de um átomo de nitrogênio e não pelo carbono (Rosypal et al., 2008) (**Figura 4**), o que faz com que estes compostos apresentem valores de pK mais baixos se comparados às diamidinas e, conseqüentemente, possuam melhor captação por membranas biológicas e melhor biodisponibilidade (Soeiro et al., 2013).



**Figura 4** Estruturas da arilimidamida DB766 (**A**) e da diamidina aromática DB75 (**B**). Enquanto um átomo de nitrogênio (setas vermelhas) conecta a amidina à estrutura aromática central em (**A**), esta função é cumprida por um átomo de carbono (setas azuis) em (**B**) (Fonte: adaptado de De Souza et al., 2004 e Batista et al., 2010a).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* realizados com a DB766 revelaram a excelente atividade desta AIA sobre formas sanguíneas e amastigotas intracelulares do *T. cruzi*. Outro ponto interessante foi a manutenção de sua excelente atividade (na faixa submicromolar) a 4°C em presença de sangue, revelando potencial uso em centros de hemoterapia. Além disso, DB766 foi igualmente ativa sobre cepas de *T. cruzi* naturalmente resistentes a nitroderivados, de distintas áreas geográficas e que circulam em diferentes ciclos de transmissão. Ensaio *in vivo* demonstraram redução da parasitemia e do parasitismo cardíaco, apresentando atividade superior à do BZ sobre as cepas Y e Colombiana, e resultando em 90 a 100% de sobrevida (Batista et

al., 2010a). Dados semelhantes também foram encontrados para as bis-AIAs DB1831, DB1965 (Da Silva et al., 2012), 18SAB075 e 16DAP002 (Timm et al., 2014), que revelaram importante atividade sobre distintas cepas de *T. cruzi* e alta seletividade *in vitro*.

Em busca do desenvolvimento de novos fármacos para doenças negligenciadas, o “Consortium for Parasitic Drug Development” foi desenvolvido. O CPDD integra uma equipe multidisciplinar de várias instituições universitárias, acadêmicas e não governamentais e que, apoiadas pelo programa Melinda e Bill Gates, aborda o desenho e síntese de novos agentes aromáticos (como amidinas) explorando ainda aspectos de mecanismos de ação, farmacologia, toxicologia. O composto DB289 (prodruga da furamidina – DB75) sintetizado pelo Dr. David Boykin foi submetido a ensaio clínico para doença do sono, tendo infelizmente sido interrompido na fase III devido a eventos de toxicidade renal (Soeiro et al., 2013).

Estes dados estimulam a continuidade de estudos com esta nova classe de compostos, sobre distintas cepas representantes das diferentes linhagens do parasito, incluindo aquelas naturalmente resistentes a nitroderivados, explorando seu perfil de toxicidade e mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* o que representa etapas fundamentais na descoberta de compostos promissores para terapias alternativas para doença de Chagas (Ribeiro et al., 2009).

### **1.2.2 Inibidores de fosfodiesterases**

Na contracorrente do conceito conhecido como “magic bullet”, cunhado por Paul Ehrlich, a avaliação de enzimas altamente conservadas entre parasitos e hospedeiros como possíveis alvos farmacológicos tem sido proposta, em especial aquelas que já são exploradas para este fim em mamíferos (Seebeck et al., 2011). Esta ideia claramente se aplica às hidrolases de nucleotídeos cíclicos, fosfodiesterases (PDEs), que têm como função exclusiva a interrupção de sinais intracelulares através da clivagem de AMPc e GMPc, sendo, portanto, reguladores críticos de diversos processos fisiológicos e patológicos (Azevedo et al., 2014). Como as PDEs são alvos de uma série de fármacos em uso clínico para o tratamento de diversas condições (como claudicação intermitente, doença pulmonar obstrutiva crônica e disfunção erétil), a triagem fenotípica de seus inibidores sobre infecções parasitárias é favorecida pelo vasto conhecimento acerca de ferramentas

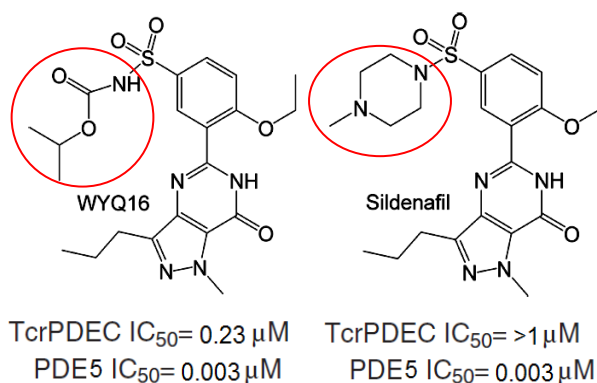
metodológicas *in vitro* e *in vivo* e interpretação dos dados (De Koning et al., 2012), o que torna estes compostos importantes fontes de investigação.

Em cinetoplastídeos, etapas de diferenciação e regulação do ciclo celular estão sob o controle da sinalização por nucleotídeos cíclicos (Wang et al., 2012) e o caráter essencial da manutenção de níveis adequados destes sinalizadores tem sido relacionado à osmorregulação, viabilidade e virulência *in vivo* (Oberholzer et al., 2007; Schoijet et al., 2011). O genoma desta ordem codifica para quatro famílias de PDEs (PDEA, PDEB1, PDEB2, PDEC e PDED), diferentemente dos humanos, que contam com vinte e um genes, categorizados em onze famílias (Woodring & Pollastri, 2014). Em *T. cruzi*, PDEA é específica de cAMP com Km elevado (Alonso et al., 2007). PDEB1 e PDEB2 são específicos de cAMP e contêm dois domínios GAF “upstream” dos seus domínios catalíticos (Oberholzer et al., 2007; Heikaus et al., 2009). PDEC contém um domínio de tipo FYVE na sua extremidade N-terminal e hidrolisa tanto cAMP como cGMP (Kunz et al., 2005; King-Keller et al., 2010), tendo sido relacionada à regulação osmótica (Schoijet et al., 2011). Já PDED e seus ortólogos não foram investigados experimentalmente até o momento (Wang et al., 2012).

A maioria das investigações neste campo concentra-se, em especial, em alterar a especificidade de inibidores existentes de isoformas humanas para PDEs de tripanossomatídeos (Makin & Gluenz, 2015). Neste contexto, o consórcio PDE4NPD, um projeto de quatro anos, financiado pela União Europeia e gerido pela VU University (Amsterdam, Holanda), foi lançado com o objetivo de desenvolver novos medicamentos contra quatro doenças parasitárias negligenciadas: doença do sono, doença de Chagas, leishmaniose e esquistossomose. O consórcio conta com o trabalho colaborativo entre instituições privadas e públicas de sete países, incluindo o Brasil, representado pela Fundação Oswaldo Cruz (PDE4NPD Homepage, 2015; TI Pharma Homepage, 2015).

A ausência de receptores acoplados à proteína G, a presença de adenilil ciclases estruturalmente diferentes, a escassez de proteínas efetoras conhecidas de AMPc e a necessidade imprescindível deste mensageiro para a regulação de processos biológicos em cinetoplastídeos sugerem uma bioquímica e uma biologia celular significativamente diferentes das encontradas em mamíferos. Outro ponto a ser considerado no desenho de inibidores (**Figura 5**) são modificações estruturais entre as enzimas de mamíferos e destes parasitos. Estes apresentam uma região peculiar chamada de *P pocket*<sup>o</sup>, um sítio a ser explorado quanto à sua inibição

estérica e funcional a partir do desenho de inibidores específicos (De Koning et al., 2012).



**Figura 5** Estrutura química do sildenafil e do seu análogo WYQ16. Pequenas alterações estruturais resultam em modificações significativas na atividade dos inibidores sobre a isoforma PDEC de *Trypanosoma cruzi* (Fonte: adaptado de Woodring & Pollastri, 2014).

Desta forma, as equipes participantes do consórcio têm adaptado sua *expertise* em química medicinal e nas diferentes faces dos ensaios pré-clínicos (*in silico*, enzimática, HTS, triagem fenotípica, ADMET, cristalografia, parasitologia molecular, validação de alvos, farmacologia) para a triagem e desenvolvimento de inibidores específicos para parasitos, uma vez que o volume de pesquisas acerca de fármacos agindo sobre PDEs humanas fornece uma valiosa fonte de compostos líderes e tecnologia metodológica (Tagoe et al., 2015).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de eficácia e segurança de novas moléculas amidínicas e de inibidores de fosfodiesterase sobre infecção *in vitro* e *in vivo* pelo *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar perfil de atividade tripanocida *in vitro* de novos compostos explorando diferentes cepas e formas evolutivas do parasito, caracterizando propriedades relativas à reversibilidade, dose-resposta, cinética de ação e ao potencial uso em profilaxia de bancos de sangue;
- b) Investigar *in vitro* aspectos de toxicidade, mutagenicidade e impacto na fisiologia das células hospedeiras frente à incubação os novos compostos;
- c) A partir dos itens **a** e **b**, definir o índice de seletividade (IS) dos compostos visando identificar os mais promissores (IS > 50) para realização de estudos *in vivo*;
- d) Verificar a ação dos compostos selecionados (itens **a-c**) durante a infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi*, através de abordagens parasitológicas e clínicas;
- e) Correlacionar a atividade e seletividade dos compostos testados com o fármaco de referência para DC, o benzonidazol (*in vitro* e *in vivo*).

### 3 ARTIGOS

#### 3.1 Artigo I

O trabalho “*In Vitro and In Vivo Studies of the Biological Activity of Novel Arylimidamides against Trypanosoma cruzi*”, publicado no periódico “Antimicrobial Agents and Chemotherapy” em 2014, está em concordância com os objetivos descritos na presente dissertação.

Nesta primeira fase, foram avaliadas a atividade biológica, a toxicidade e a seletividade de 6 bis-arilimidamidas (DB1966, DB1967, DB1968, DB1979, DB1989 e DB1995) e 9 mono-arilimidamidas (DB1996, DB1997, DB1980, DB2001, DB2002, DB2003, DB2004, DB2006 e DB2007) sobre infecção por *T. cruzi*. Os resultados mostram que as AIs dicatiônicas são significativamente mais ativas (valores de EC<sub>50</sub> variando de 0,03 a 1 µM) tanto sobre tripomastigotas sanguíneos como sobre amastigotas intracelulares do parasito quando comparadas aos compostos monocatiônicos. Importante destacar que a maioria das bis-AIs manteve sua ação tripanocida mesmo em incubações a 4°C em presença de 96% de sangue de camundongo, sugerindo seu potencial uso na profilaxia de bancos de sangue. Todas as bis-AIs foram mais ativas que o BZ (EC<sub>50</sub> variando entre 0,03 e 1 µM), e DB1967 e DB1989 apresentaram moderados índices de seletividade (> 20), o que estimulou a avaliação sobre modelos experimentais para a infecção aguda pelo *T. cruzi*. Os estudos *in vivo* mostraram que, embora ambas as bis-AIs foram capazes de reduzir significativamente os níveis de parasitemia, não se observou proteção contra a mortalidade comparável à do BZ. Nossos dados revelam excelente ação *in vitro* das AIs, ressaltando a importância de dois grupamentos catiônicos terminais para a manutenção da eficácia contra *T. cruzi* e baixa toxicidade. Desta forma, o trabalho contribui para o desenvolvimento racional de novas moléculas desta classe, com o objetivo de identificar novas alternativas para o tratamento da doença de Chagas.

## ***In Vitro* and *In Vivo* Studies of the Biological Activity of Novel Arylimidamides against *Trypanosoma cruzi***

J. S. De Araújo, C. F. Da Silva, D. G. J. Batista, P. B. Da Silva, M. B. Meuser, C. A. F. Aiub, M. F. V. da Silva, C. F. Araújo-Lima, M. Banerjee, A. A. Farahat, C. E. Stephens, A. Kumar, D. W. Boykin and M. N. C. Soeiro  
*Antimicrob. Agents Chemother.* 2014, 58(7):4191. DOI:  
10.1128/AAC.01403-13.  
Published Ahead of Print 3 March 2014.

---

Updated information and services can be found at:  
<http://aac.asm.org/content/58/7/4191>

---

<b>SUPPLEMENTAL MATERIAL</b>	<i>These include:</i> <a href="#">Supplemental material</a>
<b>REFERENCES</b>	This article cites 28 articles, 7 of which can be accessed free at: <a href="http://aac.asm.org/content/58/7/4191#ref-list-1">http://aac.asm.org/content/58/7/4191#ref-list-1</a>
<b>CONTENT ALERTS</b>	Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), <a href="#">more»</a>

---

---

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>  
To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

---

# In Vitro and In Vivo Studies of the Biological Activity of Novel Arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*

J. S. De Araújo,<sup>a</sup> C. F. Da Silva,<sup>a</sup> D. G. J. Batista,<sup>a</sup> P. B. Da Silva,<sup>a</sup> M. B. Meuser,<sup>a</sup> C. A. F. Aiub,<sup>b</sup> M. F. V. da Silva,<sup>b</sup> C. F. Araújo-Lima,<sup>c</sup> M. Banerjee,<sup>d</sup> A. A. Farahat,<sup>d,e</sup> C. E. Stephens,<sup>f</sup> A. Kumar,<sup>d</sup> D. W. Boykin,<sup>d</sup> M. N. C. Soeiro<sup>a</sup>

Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil<sup>a</sup>; Departamento de Genética e Biologia Molecular<sup>b</sup> and Departamento de Biofísica e Biometria,<sup>c</sup> Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; Department of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, Georgia, USA<sup>d</sup>; Department of Pharmaceutical Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mansoura University, Mansoura, Egypt<sup>e</sup>; Department of Chemistry and Physics, Georgia Regents University, Augusta, Georgia, USA<sup>f</sup>

**Fifteen novel arylimidamides (AIAs) (6 bis-amidino and 9 mono-amidino analogues) were assayed against *Trypanosoma cruzi* *in vitro* and *in vivo*. All the bis-AIAs were more effective than the mono-AIAs, and two analogues, DB1967 and DB1989, were further evaluated *in vivo*. Although both of them reduced parasitemia, protection against mortality was not achieved. Our results show that the number of amidino-terminal units affects the efficacy of arylimidamides against *T. cruzi*.**

Chagas disease (CD) is caused by *Trypanosoma cruzi* and affects more than 8 million people worldwide (1–5). Benznidazole (BZ) and nifurtimox (NF) are used for the treatment of CD, but because of their well-known toxicity and limited efficacy in the later chronic phase of the disease, new drugs are urgently needed (6–9). We have evaluated several classes of natural and synthetic compounds, including arylimidamides (AIAs), aromatic diamidine (AD) derivatives with extraordinary activity against *T. cruzi* and other trypanosomatids, both *in vitro* (10–16) and *in vivo* (17, 18). In AIAs, the imino group is linked via an anilino nitrogen, while in classical amidines, it is directly attached to an aryl ring, yielding reduced pK values (14). Here, we report the results of *in vitro* and *in vivo* activity studies and mutagenicity and selectivity assessments of new AIAs (6 bis-amidino analogues, DB1966, DB1967, DB1968, DB1979, DB1989, and DB1995, and 9 mono-amidino analogues, DB1996, DB1997, DB1980, DB2001, DB2002, DB2003, DB2004, DB2006, and DB2007), which provide insight on the relevance of one or two terminal amidino units for biological activity.

We synthesized the mono- and bis-arylimidamides (see structures in Table 1) as reported (19–21). Benznidazole (BZ) (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco, LAFEPE, Brazil) and gentian violet (Sigma-Aldrich) were used as reference drugs (22). Primary cultures of cardiac cells (CC) were obtained as reported (18, 23). The Y strain of *T. cruzi* was used, and bloodstream trypomastigotes (BT) and intracellular trypomastigote forms were assayed as described previously (18, 23). Mammalian cell cytotoxicity of AIAs was evaluated on uninfected CC incubated up to 48 h at 37°C with each compound (0 to 32 μM); morphology, spontaneous contractibility, and cell death rates were measured for determination of the 50% effective compound concentrations (EC<sub>50</sub>s) (24). For trypanocidal analysis, BT were incubated at 37°C for 24 h with nontoxic concentrations of the compounds to determine the EC<sub>50</sub> (24). For analysis with intracellular amastigotes, after 24 h of parasite-host cell interaction, increasing nontoxic doses of the compounds were added for 48 h, and drug activity was estimated by calculating the infection index (II) as reported (12, 24). The data shown are the means ± standard deviations from 2 to 4 experiments run in duplicate. A bacterial reverse mutation (Ames) test and a cytotoxicity assay were performed as proposed

by Maron and Ames (25) and Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) test guideline 471 (26). Statistical analysis was performed by the analysis of variance test ( $P \leq 0.05$ ) (22).

Male Swiss Webster mice (18 to 21 g) (Fundação Oswaldo Cruz Animal Facility [CECAL/FIOCRUZ], Brazil) were housed six per cage in a conventional room at 20 to 24°C under a 12/12-h light/dark cycle, with sterilized water and chow provided *ad libitum*. Infection was achieved by intraperitoneal (i.p.) injection of 10<sup>4</sup> BT (Y strain), and the mice (6 per group) were uninfected (noninfected and nontreated), untreated (infected and treated with vehicle), or treated with different doses of DB1989 and DB1967 (infected and treated with 0.2-ml i.p. daily doses up to 50 mg/kg of body weight). Infected mice were treated with 100 mg/kg/day BZ orally once a day. Treatment was given at the 5th (parasitemia onset) and 8th day postinfection (dpi) (parasitemia peak). Parasitemia levels, body weights, and percentage of cumulative mortality were checked until 30 days posttreatment, as reported (18). All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA 0028/09).

BT incubated for 24 h at 37°C showed that 12 of the 15 compounds (all but DB1996, DB1997, and DB2002) had superior trypanocidal activities ( $P \leq 0.05$ ) compared to that of BZ (EC<sub>50</sub>, 13 μM). Five of the bis-AIAs (DB1966, DB1967, DB1968, DB1979, and DB1989) yielded EC<sub>50</sub>s of  $\leq 0.1$  μM. The bis-AIA DB1989, the fastest-acting trypanocidal compound, provided an EC<sub>50</sub> of 2.7 μM after 2 h (Table 1). Bis-AIAs also displayed the best

Received 2 July 2013 Returned for modification 27 October 2013

Accepted 24 February 2014

Published ahead of print 3 March 2014

Address correspondence to M. N. C. Soeiro, soeiro@ioc.fiocruz.br.

J.S.D.A., C.F.D.S., and D.G.J.B. equally contributed to this work.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01403-13>.

Copyright © 2014, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.01403-13



**TABLE 1** AIA activity against bloodstream trypomastigotes and intracellular (amastigote) forms of *T. cruzi* (Y strain) and the corresponding selectivity indexes

Compound structure	Compound name	Bloodstream trypomastigotes			EC <sub>50</sub> (mean ± SD) (μM) at 37°C in RPMI at:		Amastigotes	
		EC <sub>50</sub> (mean ± SD) (μM) at 37°C in RPMI at:		SI at 37°C at 24 h	EC <sub>50</sub> (mean ± SD) (μM) at 4°C in blood at:		EC <sub>50</sub> (mean ± SD) (μM) at 37°C in RPMI at 48 h	SI at 48 h
		2 h	24 h		2 h	24 h		
	DB1966 <sup>a</sup>	>3.5	0.04 ± 0	30	>32	22 ± 3	0.09 ± 0.08	13
	DB1967 <sup>a</sup>	>3.5	0.04 ± 0.02	88	>32	3.75 ± 0.3	0.03 ± 0.006	40
	DB1968 <sup>a</sup>	>3.5	0.08 ± 0.02	15	>32	2.9 ± 0.4	0.1 ± 0.1	12
	DB1979 <sup>a</sup>	3.5	0.1 ± 0.04	30	>32	10.8 ± 2.7	1 ± 1.4	3
	DB1989 <sup>a</sup>	2.7 ± 1.6	0.05 ± 0.01	70	>32	3.9 ± 1.3	0.06 ± 0.03	20
	DB1995 <sup>a</sup>	>32	1.0 ± 0.8	3	>32	25 ± 9	0.9 ± 0.35	1.2
	DB1980	>32	5.8 ± 4	0.2	>32	>32	>0.39	>0.39
	DB1996	>32	13 ± 12	0.09	>32	>32	>0.39	3
	DB1997	>32	15 ± 5	0.08	>32	>32	>0.39	3
	DB2001	>32	4.8 ± 1.5	0.2	>32	21 ± 6	>0.39	0.25
	DB2002	>32	20 ± 10	0.15	>32	>32	>0.39	3
	DB2003	13 ± 3	4.3 ± 1.9	0.9	>32	>32	>0.39	9
	DB2004	12 ± 3.9	2.9 ± 1.5	0.35	>32	>32	>0.39	2.5
	DB2006	12 ± 60	5.9 ± 10	0.5	>32	22 ± 0.9	>0.39	9
	DB2007	11 ± 60	1.2 ± 10	1	>32	>32	>0.39	3
	BZ	>50	13 ± 2	77	>250	>250	3.6 ± 1.7	>277

<sup>a</sup> Bis-AIA.

effect under blood bank conditions (in blood at 4°C); DB1967, DB1968, and DB1989 showed  $EC_{50}$ s ranging from 2.9 to 3.9  $\mu$ M, while BZ was ineffective at up to 250  $\mu$ M (Table 1). The most selective compounds against BT were DB1967 (selectivity index [SI], 88) and DB1989 (SI, 70) (Table 1). The mono-AIAs DB1980, DB2001, and DB2004 were the most toxic against cardiac cell cultures at 48 h. Mono-AIAs were ineffective after 48 h at 37°C on *T. cruzi*-infected cultures (Table 1). Similar to the effect against BT, four bis-AIAs (DB1966, DB1967, DB1968, and DB1989) were the most effective against intracellular parasites ( $EC_{50}$ s of  $\leq 0.1$   $\mu$ M) (Table 1). Mono-AIAs displayed very low selectivities, while the bis-AIAs DB1989 and DB1967 exhibited the highest SI levels (20 and 40, respectively) against the intracellular parasites (Table 1). A bacterial reverse mutation (Ames) test indicated no major mutagenic potential (mutagenic index,  $< 2$ ) with DB1989 (see Table S1 in the supplemental material) or BZ (data not shown). Due to their excellent *in vitro* activities against the two parasite forms and reasonable selectivities, DB1967 and DB1989 were evaluated *in vivo*. At 8 dpi (parasitemia peak), DB1989 reduced parasitemia (by 40, 76, and 75% with 12.5, 25, and 50-mg/kg/day doses, respectively), while BZ suppressed parasitemia (Fig. 1A). BZ resulted in 100% survival of the mice, but no dose of DB1989 prevented mortality triggered by the infection (Fig. 1B); the highest dose (50 mg/kg/day) produced higher mortality rates compared to that of the untreated group, possibly due to compound toxicity (a ponderal curve shows higher weight [Fig. 1C]). DB1967 produced dose-response suppression (67 to 87%) of parasitemia but an earlier and higher mortality rate (100% for all DB1967-treated groups, likely due to toxicity; data not shown).

AIAs such as DB766 are effective *in vitro* and *in vivo* against intracellular pathogens that cause human and animal pathologies (24, 27–29) and exhibit stronger activity than those of classical diamidines (possibly due to their lower  $pK_a$  values), better bioavailability, and improved cell membrane permeability (28). Similar to their effect against *Leishmania*, bis-AIAs are highly active against *T. cruzi* (12, 15, 22). DB766 showed a selective effect against intracellular amastigotes and upon a large panel of *T. cruzi* strains, including naturally resistant strains, with a higher efficacy than those of the reference drugs (18).

This work explores the correlation between the trypanocidal activity/selectivity of AIAs with one or two terminal amidino groups. Bis-AIAs were most potent against the two parasite forms relevant to mammalian infection (the bloodstream and intracellular forms), demonstrating that two terminal amidino centers confer a higher parasitocidal effect than those bearing only one. The importance of the second amidino center is seen by comparing the results for DB1967 with those for DB2002 (500-fold activity difference; Table 1), which differ only in the absence of the second amidino group in DB1967. These results corroborate previous findings for classical diamidines, confirming the requirement of a diamidino unit for effectiveness against *T. cruzi* (15). The bis-AIAs DB1967, DB1968, and DB1989 maintained good trypanocidal activity at 4°C with 96% mouse blood, similar to the activities of other bis-AIAs, including DB766 (18), DB745 (30), and DB1831 (22).

All tested bis-AIAs have alkoxy groups of approximately the same size and with similar *in vitro* activities ( $EC_{50}$ s of  $\leq 0.1$   $\mu$ M). DB1967, with only one 2-propoxy group, has essentially the same antitrypanosomal activity as that of DB766 (18), which has two such groups; yet, DB1967 is more toxic to animals than DB766,

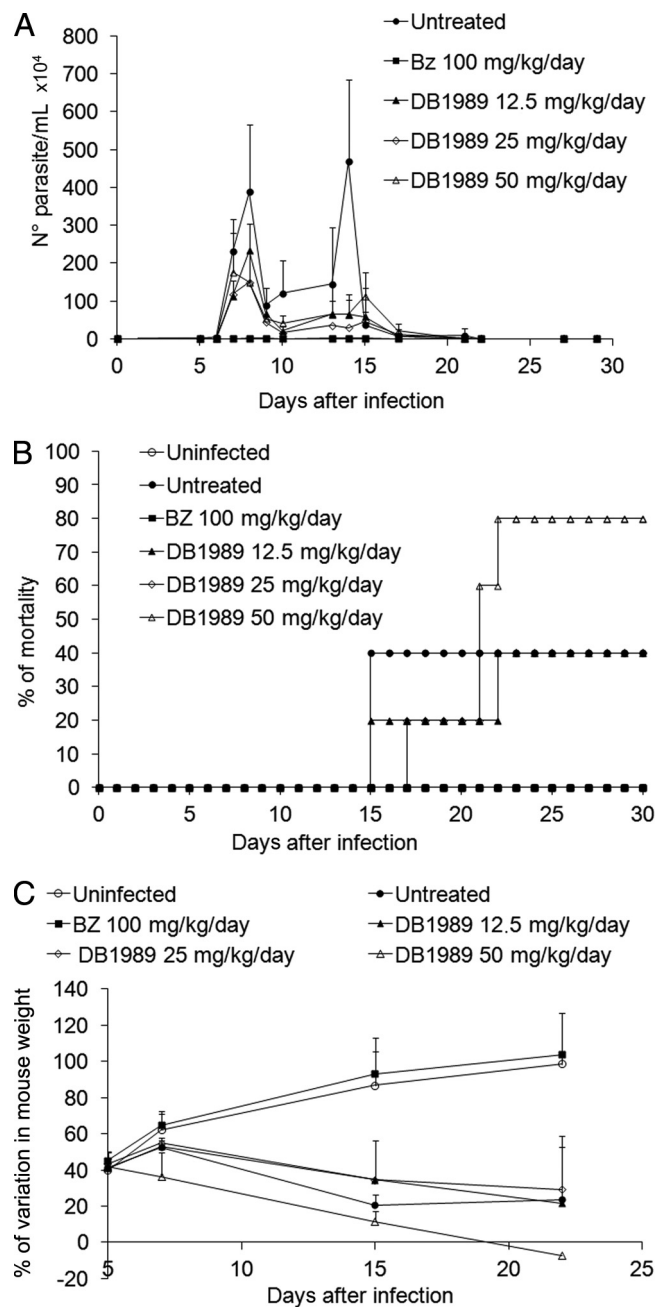


FIG 1 *In vivo* effect of DB1989 on acute mouse model of infection with the Y strain of *T. cruzi*. Parasitemia (A), mortality rates (B), and ponderal curve (C) are shown. The effects of DB1989 (i.p.) and BZ (oral) were followed using doses (up to 50 mg/kg/day for DB1989 and 100 mg/kg/day for BZ) administered at the 5th and 8th dpi.

suggesting that two moderately sized alkoxy groups reduce animal toxicity. Generally, the activities of the mono-AIAs do not vary significantly with structure (Table 1). Most bis-AIAs were also less toxic toward cardiac cells than were the mono-AIAs. Presently, up to the maximum dose tested, genotoxicity was absent, and only a mild mutagenicity profile was observed when DB1989 was assayed against the *Salmonella enterica* Typhimurium TA98 strain (see Table S1 in the supplemental material), which is suggestive of a frameshift mutation, probably during the

DNA repair or duplication process, adding GC pairs into the genome. Although OECD test guideline 471 recommends using up to 5 mg of a tested compound, the high activity of DB1989 toward the bacterial strains impaired assaying higher AIA concentrations that may mask mutagenic aspects, demanding additional toxicological studies.

DB1989 and DB1967 were moved to *T. cruzi* *in vivo* models due to their high *in vitro* activities and reasonable selectivities. Although parasitemia was reduced, neither DB1967 nor DB1989 protected against mortality. This is in contrast to results with DB766 (18) and DB1965, a mesylate salt form of DB1831 (22) which showed *in vivo* efficacy comparable to that of BZ. The reduction of parasitemia observed with DB1967 correlates with the *in vitro* data obtained with bloodstream and intracellular parasites (EC<sub>50</sub>s of 30 to 40 nM). As low toxicity was observed *in vitro*, the higher mortality rate of the DB1967-treated mice is likely due to an organ-specific toxicity (e.g., hepatotoxicity) or arose from metabolic products of the bis-AIA.

Our data confirm the importance of two amidino centers for the trypanocidal efficacy of arylimidamides against *T. cruzi* and demonstrated that mono-AIAs are less effective and selective than bis-AIAs. Although very active *in vitro*, DB1989 and DB1967 failed to protect against *T. cruzi* infection *in vivo*, possibly due to toxicity. Since previous studies demonstrated *in vivo* efficacies comparable to that of BZ for other bis-AIAs, e.g., DB766 (18) and DB1965 (22), the synthesis of novel AIAs bearing bis-terminal pyrimidines or pyridines merits further investigation as an approach for identifying new anti-*T. cruzi* agents.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by Fiocruz and Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), CAPES, PROEP, and the Consortium for Parasitic Drug Development (CPDD). This study was partially supported by The Bill and Melinda Gates Foundation through a subcontract with the CPDD (to D.W.B.).

We thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ and Israel Felzenszwalb for allowing us to use their facilities and laboratories.

## REFERENCES

- de Soeiro MN, De Castro SL. 2011. Screening of potential anti-*Trypanosoma cruzi* candidates: *in vitro* and *in vivo* studies. *Open Med. Chem. J.* 5:21–30. <http://dx.doi.org/10.2174/1874104501105010021>.
- World Health Organization. 2013. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report on neglected tropical diseases. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Rassi A, Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. 2012. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect. Dis. Clin. North Am.* 26:275–291. <http://dx.doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- Dumonteil E, Bottazzi ME, Zhan B, Heffernan MJ, Jones K, Valenzuela JG, Kamhawi S, Ortega J, Rosales SP, Lee BY, Bacon KM, Fleischer B, Slingsby BT, Cravioto MB, Tapia-Conyer R, Hotez PJ. 2012. Accelerating the development of a therapeutic vaccine for human Chagas disease: rationale and prospects. *Expert Rev. Vaccines* 11:1043–1055. <http://dx.doi.org/10.1586/erv.12.85>.
- Rocha MOC, Teixeira MM, Ribeiro AL. 2007. An update on the management of Chagas cardiomyopathy. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 5:727–743. <http://dx.doi.org/10.1586/14787210.5.4.727>.
- De Castro SL, Batista DG, Batista MM, Batista W, Daliry A, de Souza EM, Menna-Barreto RF, Oliveira GM, Salomão K, Silva CF, Silva PB, Soeiro MN. 2011. Experimental chemotherapy for Chagas disease: a morphological, biochemical, and proteomic overview of potential *Trypanosoma cruzi* targets of amidines derivatives and naphthoquinones. *Mol. Biol. Int.* 306928. <http://dx.doi.org/10.4061/2011/306928>.
- Soeiro MNC, Daliry A, Silva CF, Batista DGJ, De Souza EM, Oliveira GM, Salomão K, Batista MM, Pacheco M, Silva PB, Santa-Rita RM, Menna-Barreto RFS, Boykin DW, De Castro SL. 2009. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions through *in vivo* and *in vitro* studies. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104:301–310. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762009000900040>.
- Clayton J. 2010. Chagas disease 101. *Nature* 465:S4–S5. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09220>.
- Lima FM, Oliveira P, Mortara RA, Silveira JF, Bahia D. 2010. The challenge of Chagas' disease: has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *N. Biotechnol.* 27:837–843. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2010.02.003>.
- Wilson WD, Tanious FA, Mathis A, Tevis D, Hall JE, Boykin DW. 2008. Antiparasitic compounds that target DNA. *Biochimie* 90:999–1014. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2008.02.017>.
- Soeiro MN, Werbovets K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. 2013. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology* 8:1–23. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182013000292>.
- Silva CF, Batista MM, De Souza EM, Mirelles MNL, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MNC. 2007. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3803–3809. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00047-07>.
- Silva CF, Batista MM, Mota RA, de Souza EM, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MN. 2007. Activity of “reversed” diamidines against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Biochem. Pharmacol.* 73:1939–1946. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2007.03.020>.
- Rosypal AC, Werbovets KA, Salem M, Stephens CE, Kumar A, Boykin DW, Hall JE, Tidwell RR. 2008. Inhibition by dications of *in vitro* growth of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis. *J. Parasitol.* 94:743–749. <http://dx.doi.org/10.1645/GE-1387R1.1>.
- Pacheco MGO, Silva CF, De Souza EM, Batista MM, Silva PB, Kumar A, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MNC. 2009. Activity of heterocyclic cationic molecules against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Exp. Parasitol.* 123:73–80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2009.06.004>.
- De Souza EM, da Silva PB, Nefertiti AS, Ismail MA, Arafa RK, Tao B, Nixon-Smith CK, Boykin DW, Soeiro MN. 2011. Trypanocidal activity and selectivity *in vitro* of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 127:429–435. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2010.10.010>.
- Da Silva CF, Batista MM, Batista DG, de Souza EM, da Silva PB, de Oliveira GM, Meuser AS, Shareef AR, Boykin DW, Soeiro MN. 2008. *In vitro* and *in vivo* studies of the trypanocidal activity of a diarylthiophene diamidine against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:3307–3314. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00038-08>.
- Batista DG, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MN. 2010. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2940–2952. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.01617-09>.
- Stephens CE, Tanious F, Kim S, Wilson WD, Schell WA, Perfect JR, Franzblau SG, Boykin DW. 2001. Diguandino and “reversed” diamidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. *J. Med. Chem.* 44:1741–1748. <http://dx.doi.org/10.1021/jm000413a>.
- Reid C, Farahat AA, Zhu X, Pandharkar T, Boykin DW, Werbovets KA. 2012. Antileishmanial bis-arylimidamides: DB766 analogs modified in the linker region and bis-arylimidamide structure-activity relationships. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22:6806–6810. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2012.06.037>.
- Banerjee M, Farahat AA, Kumar A, Wenzler T, Brun R, Munde MM, Wilson WD, Zhu X, Werbovets KA, Boykin DW. 2012. Synthesis, DNA binding and antileishmanial activity of low molecular weight bis-arylimidamides. *Eur. J. Med. Chem.* 55:449–454. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2012.06.058>.
- Da Silva CF, Batista DG, Oliveira GM, de Souza EM, Hammer ER, da Silva PB, Daliry A, Araujo JS, Britto C, Rodrigues AC, Liu Z, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro MN. 2012. *In vitro* and *in vivo* investigation of the efficacy of arylimidamide DB1831 and its mesylated

- salt form—DB1965—against *Trypanosoma cruzi* infection. PLoS One 7:e30356. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0030356>.
23. Meirelles MN, Araujo-Jorge TC, Miranda CF, De Souza W, Barbosa HS. 1986. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. Eur. J. Cell Biol. 41:198–206.
  24. Soeiro MD, de Souza EM, da Silva CF, da Gama Jaen Batista D, Batista MM, Pavão BP, Araújo JS, Aiub CA, da Silva PB, Lionel J, Britto C, Kim K, Sulikowski G, Hargrove TY, Waterman MR, Lepesheva GI. 2013. *In vitro* and *in vivo* studies of the antiparasitic activity of sterol 14 $\alpha$ -demethylase (CYP51) inhibitor VNI against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother. 57:4151–4163. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00070-13>.
  25. Maron DM, Ames BN. 1983. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. Mutat. Res. 113:173–215. [http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161\(83\)90010-9](http://dx.doi.org/10.1016/0165-1161(83)90010-9).
  26. Organization for Economic Cooperation and Development. 1997. Test guideline 471. Bacterial reverse mutation test. In OECD guideline for testing of chemicals. Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, France.
  27. Werbovetz K. 2006. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. Curr. Opin. Investig. Drugs 7:147–157.
  28. 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, Werbovetz KA. 2010. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. Antimicrob. Agents Chemother. 54:2507–2516. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.00250-10>.
  29. Zhu X, Liu Q, Yang S, Parman T, Green CE, Mirsalis JC, de Nazaré Correia Soeiro M, Mello de Souza E, da Silva CF, da Gama Jaen Batista D, Stephens CE, Banerjee M, Farahat AA, Munde M, Wilson WD, Boykin DW, Wang MZ, Werbovetz KA. 2012. Evaluation of arylimidamides DB1955 and DB1960 as candidates against visceral leishmaniasis and Chagas' disease: *in vivo* efficacy, acute toxicity, pharmacokinetics, and toxicology studies. Antimicrob. Agents Chemother. 56:3690–3699. <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.06404-11>.
  30. Da Silva CF, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MN. 2011. *In vitro* trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. J. Antimicrob. Chemother. 66:1295–1297. <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr140>.

Table S1 – Induction of His<sup>+</sup> revertants in *Salmonella enterica* (Typhimurium strains) by DB1989 in reverse mutation test without metabolic activation

Strain	[ ] nM	His <sup>+</sup> ± DP <sup>b</sup>	MI <sup>a</sup>	Survival % <sup>c</sup>
TA97	0	120 ± 5	1.00	100
	1.11	102 ± 18	0.85	100
	2.22	114 ± 4	0.96	100
	4.45	91 ± 20	0.76	100
	8.90	69 ± 6	0.58	100
	17.75	67 ± 6	0.56	100
TA98	0	34 ± 1	1.00	100
	1.11	45 ± 6	1.32	100
	2.22	79 ± 12	<b>2.32</b>	100
	4.45	75 ± 1	<b>2.21</b>	100
	8.90	79 ± 1	<b>2.32</b>	100
	17.75	73 ± 4	<b>2.16</b>	86
TA100	0	62 ± 9	1.00	100
	1.11	57 ± 24	0.93	<b>35</b>
	2.22	83 ± 9	1.35	<b>15</b>
	4.45	81 ± 1	1.31	<b>27</b>
	8.90	76 ± 6	1.23	<b>52</b>
	17.75	91 ± 1	1.48	<b>50</b>
TA102	0	174 ± 30	1.00	100
	1.11	192 ± 37	1.11	<b>13</b>
	2.22	142 ± 10	0.82	<b>20</b>
	4.45	194 ± 2	1.11	<b>27</b>
	8.90	139 ± 18	0.80	<b>22</b>
	17.75	160 ± 10	0.92	<b>20</b>

Induction of His<sup>+</sup> revertants in *S. enterica* (Typhimurium strains) by DB1989 in reverse mutation test without metabolic activation.  
<sup>a</sup>Mutagenic index (M.I.): number of His<sup>+</sup> induced in the sample/number of spontaneous His<sup>+</sup> in the negative control (DMSO 5%).  
<sup>b</sup>Number of His<sup>+</sup>/plate: mean value ± SD of at least three experiments. <sup>c</sup>Percentage of cell survival (Surv. %) calculated in relation to the negative control. Bold numbers are statistically significant ( $p \leq 0.005$ ).

### 3 ARTIGOS

#### 3.2 Artigo II

O trabalho “Phosphodiesterase inhibitors as potencial candidates for Chagas disease therapy”, a ser submetido ao periódico “Antimicrobial Agents and Chemotherapy” em 2015, está em concordância com os objetivos descritos na presente dissertação.

Nesta segunda etapa, foram avaliadas a atividade biológica, toxicidade e seletividade, perfis de reversibilidade e efeito sobre fisiologia de células hospedeiras, de 17 inibidores de PDE (VUF11848, VUF13522, VUF13526, VUF13527, VUF13536, VUF14256, VUF14656, VUF14703, VUF14767, VUF14768, VUF14852, VUF14907, VUF14975, VUFH1601, GBR11827, BS9538 e IOTA0372). Os compostos foram selecionados a partir de bibliotecas comerciais através de estudos *in silico* e sobre a cepa CL de *T. cruzi* transfectada. Os que não apresentaram toxicidade sobre células de mamífero e que foram ativos nestes filtros foram então investigados no presente estudo. Primeiramente, os compostos foram testados em um sistema automatizado utilizando linhagens de fibroblastos L929 infectadas pela cepa Tulahuen de *T. cruzi* transfectada com o gene da  $\beta$ -galactosidase, revelando que sete deles apresentaram atividade igual ou superior à do BZ. Estabelecendo concentrações não tóxicas de até  $EC_{50} < 5 \mu M$ , os inibidores selecionados foram avaliados sobre tripomastigotas sanguíneos e amastigotas intracelulares das cepas Y e Colombiana o que revelou que independente da cepa utilizada, observa-se uma maior atividade sobre as formas multiplicativas ( $EC_{50}$  e IS valores de 0,1-1 e 77-476  $\mu M$ , respectivamente, para os compostos mais ativos). Para descartar a possibilidade de que a superior ação sobre formas intracelulares pudesse ter relação com ativação de eventos microbicidas induzidos pelos compostos na célula hospedeira, atividade sobre amastigotas extracelulares de cepa Y obtidas a partir de sobrenadante de culturas de células cardíacas e de linhagens Vero foram investigadas além do pré-tratamento das culturas de L929 antes da infecção e a soma dos dados sugere o efeito direto sobre o parasito. Por fim, a reversibilidade dos inibidores foi avaliada e os dados demonstram que alguns inibidores têm rápida ação tripanocida em tempos curtos de exposição (6 h). Os resultados estimulam a continuidade do estudo.

1 **Phosphodiesterase inhibitors as potential candidates for Chagas disease therapy**

2  
3 Julianna Siciliano de Araújo<sup>1</sup>, Patrícia Bernardino da Silva<sup>1</sup>, Marcos Meuser Batista<sup>1</sup>, Raiza  
4 Brandão<sup>1</sup>, Beatriz Philot Pavão<sup>1</sup>, Mariane Vasconcelos<sup>1</sup>, Cristina Fonseca-Berzal<sup>2</sup>, Ewald  
5 Edink<sup>3</sup>, Harry P de Koning<sup>4</sup>, Bernhard Ellinger<sup>5</sup>, Sheraz Gul<sup>6</sup>, Rob Leurs<sup>3</sup>, David W Boykin<sup>7</sup> and  
6 Maria de Nazaré Correia Soeiro<sup>1\*</sup>

7  
8  
9 <sup>1</sup> *Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de*  
10 *Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil*

11 <sup>2</sup> *Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid,*  
12 *Madrid, Spain*

13 <sup>3</sup> *Division of Medicinal Chemistry, Faculty of Sciences, Amsterdam Institute for Molecules,*  
14 *Medicines and Systems (AIMMS), VU University Amsterdam, Amsterdam, The Netherlands*

15 <sup>4</sup> *Institute of Infection, Immunity & Inflammation, College of Medical, Veterinary & Life*  
16 *Sciences, University of Glasgow, Glasgow, United Kingdom*

17 <sup>5</sup> *Department of Chemical Biology, Max Planck Institute for Molecular Physiology, Dortmund,*  
18 *Germany*

19 <sup>6</sup> *Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, USA*

20 <sup>7</sup> *Department of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, GA, USA*

21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30 **\*Corresponding author**

31 E-mail: soeiro@ioc.fiocruz.br

32 Phone Number: +55 21 25621368

33 Fax Number: +55 21 25984469

34 **Abstract**

35

36 Benznidazole (BZ) and nifurtimox, the current treatment for Chagas disease (CD) present  
37 important limitations. The epidemiological shift of CD due to the migration of infected  
38 individuals to non-endemic areas, together with the need to optimize funding sources under  
39 a multidisciplinary drug discovery program, brought to light the relevance of building private  
40 and academic collaborative efforts in this area. The consortium PDE4NPD was launched to  
41 screen and develop selective phosphodiesterase (PDE) inhibitors targeting four major tropical  
42 neglected diseases including CD. In this work, the activity and selectivity of seventeen PDE  
43 inhibitors against *Trypanosoma cruzi* were assessed through a standardized phenotypic flow  
44 chart. Firstly, PDE inhibitors were assayed against intracellular forms using L929 cell line  
45 infected by Tulahuen strain (DTU VI) through an automated system. The data reveal that nine  
46 molecules presented comparable activity as BZ. Next, these inhibitors were moved to screen  
47 their effect upon bloodstream trypomastigotes and intracellular amastigotes using another  
48 *T. cruzi* DTU (Y strain, DTU II). The findings showed that despite the parasite strain, the  
49 multiplicative forms were more susceptible as compared to trypomastigotes, displaying EC<sub>50</sub>  
50 values ranging 0.1-5.5 μM and 0.5->50 μM, respectively. The most active PDE inhibitors  
51 against intracellular forms presented high selectivity (>48-476) but unfortunately, those more  
52 active against bloodstream forms displayed mammalian cells toxicity after longer periods of  
53 incubation (≥ 48 h). The effect on a highly resistant strain (Colombiana) using one of the best  
54 inhibitors (VUF13527) confirmed the susceptible aspect of the intracellular amastigotes. Then,  
55 to rule out the possibility of indirect effect of these compounds acting towards the host cells,  
56 the previous exposition of these mammalian cells was performed followed by rinsing and then  
57 parasite infection. The results show that only a mild reduction on the parasitism was observed  
58 when PDE inhibitors despite the high effect (>80% reduction) of a positive control using an  
59 amidine (DB569). Another set of assays was next done using different sources of extracellular  
60 amastigotes and the data demonstrated that those parasites that were intracellularly  
61 converted to the multiplicative stage early released at the supernatant of cardiac cells (under  
62 a super-infection state) were susceptible to the PDE inhibitors while those that undergo the  
63 differentiation extracellularly (amastigote collected from Vero infected cells) were not. Lastly,  
64 the reversibility and fast killer profile of some inhibitors were done by “wash out” assays.  
65 Some of these inhibitors (like GBR11827) present a fast trypanocidal effect reaching EC<sub>50</sub> =  
66 3.28 μM as soon as 6 h of drug incubation while for the positive control the amidine DB745



67 was 0.04  $\mu\text{M}$ . Also, an irreversible profile was found using GBR11824, since the incubation for  
68 24 h reached quite similar efficacy as when the inhibitor was maintained for 96h (0.6 and 0.3  
69  $\mu\text{M}$ , respectively). The bulk of our data demonstrate that PDE inhibitors are promising  
70 candidates meriting further investigation in order to achieve alternative therapies for this  
71 silent neglected pathology.

72

73 **Keywords:** Chagas disease, *Trypanosoma cruzi*, phosphodiesterase, experimental  
74 chemotherapy, collaborative drug discovery, phenotypic screening

75

76

## 77 **Introduction**

78

79 Neglected Tropical Diseases (NTDs) represent an important burden in the public health field,  
80 threatening and impairing the lives of more than 1 billion people worldwide (CDC, 2015;  
81 Martín-Plaza & Chatelain, 2015). Among those, about 6 million are infected by the protozoan  
82 parasite *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas disease (CD), the leading cause of  
83 infectious cardiomyopathy in the endemic areas of 21 countries in Latin America (DNDi, 2015).  
84 The drugs currently available for the treatment of infection, benznidazole (BZ) and nifurtimox,  
85 show limited efficacy, especially in the chronic phase, and are associated with severe adverse  
86 effects, such as peripheral neuropathy, dermatitis and gastrointestinal disruptions (Bern,  
87 2015). Besides that, therapeutic failures of two triazoles inhibitors of CYP51 evaluated in  
88 clinical trials for chronic phase of CD have recently been disclosed (Chatelain, 2015; Molina et  
89 al., 2015) and, according to the data published by the BENEFIT study, no correlation between  
90 etiological therapy (BZ) for chronic patients and protection against cardiomyopathy was found  
91 (Maguire, 2015). These results, once again, reinforces the importance of the continuous  
92 searching for new therapeutic alternatives for DC through translational and multidisciplinary  
93 projects, such as those developed by Drs. William Campbell and Satoshi Omura and Dr. Youyou  
94 Tu, whose studies of new treatments against onchocerciasis, filariasis and malaria shared the  
95 Nobel Prize for Medicine and Physiology in 2015 (Nobel Prize Homepage, 2015).

96

97 Although CD is historically a disease associated with poor and rural regions, with the increase  
98 in migration in the last decades, patients number is growing rapidly in non-endemic areas,  
99 such as the USA, Canada, Australia, Japan and Europe (Coura, 2015). This shift in the

100 epidemiological profile of DC, together with the growing need for resources' optimization, has  
101 brought to light the urgency of establishing new international collaborative models involving  
102 industry, academia, biotechnology companies and regulatory agencies (Goldman, 2012). In  
103 this context, the consortium PDE4NPD, a four-year, EU-funded project managed by VU  
104 University Amsterdam, was established to develop novel drugs targeting the  
105 phosphodiesterases (PDEs) of the etiological agents of four major NTDs: Chagas disease,  
106 sleeping sickness, leishmaniasis and schistosomiasis (PDE4NPD Homepage, 2015; TI Pharma  
107 Homepage, 2015). PDEs are a group of highly conserved hydrolases that control the  
108 intracellular levels of cyclic nucleotides by hydrolyzing cAMP and cGMP, intracellular second  
109 messengers that play a central role in signal transduction cascades (Azevedo et al., 2014). This  
110 high conservation between host and parasite enzymes could be turned from an obstacle to a  
111 major tool for drug finding, especially if it is already used as a pharmacological target in  
112 humans and if its parasite homologue is essential, since expertise and technology gained with  
113 the mammalian target studies could be applied basically to developing selective inhibitors  
114 (Seebeck et al., 2011). In kinetoplastids, four families of class I PDEs (PDEA–D) have been  
115 identified (Woodring & Pollastri, 2014) and it has already been described that the enzyme is  
116 directly involved in cell division, osmoregulation and in vivo virulence, being essential for  
117 parasites' fitness and survival (Oberholzer et al., 2007; King-Keller et al., 2010; Schoijet et al.,  
118 2011).

119

120 The research teams have adapted their expertise in both experimental chemotherapy and  
121 medicinal chemistry in order to screen and synthesize selective inhibitors, validate the  
122 parasites' PDEs as pharmacological targets of these compounds and increase knowledge  
123 about cyclic nucleotide metabolism. Therefore, establishing a minimum set of criteria and  
124 decision gates is crucial to guarantee reliable results, since the identification of hits and leads  
125 from compounds phenotypically screened in vitro remains a key step to progress them  
126 through drug development chain (Nwaka & Hudson, 2006; Romanha et al., 2010; Chatelain,  
127 2015). Hereupon, in the present study, biological activity and selectivity of twenty PDE  
128 inhibitors, selected from a general screening at University of Antwerp/Belgium, were  
129 determined in vitro using a well-established flow chart based on the Target Product Profile for  
130 Chagas disease (DNDi, 2015). As recommended, strains of *T. cruzi* belonging to different  
131 discrete typing units (DTUs) were evaluated, as well as both morphological stages of the  
132 parasite relevant for mammalian infection.

133

## 134 **Materials and Methods**

135

136 PDE inhibitors: 10 mM stock solutions of 17 compounds (**Table 1**), synthesized by Dr. Rob Leurs  
137 (VU University Amsterdam, The Netherlands), were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO,  
138 maximum final concentration of 1%). Benznidazole (2-nitroimidazole; Laboratório  
139 Farmacêutico do Estado de Pernambuco, Brazil) was used as a reference drug (Timm et al.,  
140 2014a).

141

142 Mammalian cells: Primary cardiac cells (CC) cultures were obtained from mice embryos and  
143 plated onto coverslips in 96 or 24-well plates previously coated with 0.01% gelatin (Meirelles  
144 et al., 1986) while L929 fibroblasts lineages were grown as described (Romanha et al., 2010).

145

146 Parasites: Bloodstream trypomastigotes (BT) of Y and Colombiana strains of *T. cruzi* were  
147 obtained by cardiac puncture of infected Swiss Webster mice, on the parasitemia peak  
148 (Meirelles et al., 1986; Batista et al., 2010). Trypomastigotes of Tulahuen strain expressing the  
149  $\beta$ -galactosidase gene from *Escherichia coli* were collected from the supernatant of infected  
150 L929 cultures as reported (Buckner et al., 1996; Romanha et al., 2010). Extracellular  
151 amastigotes of Y strain were obtained from the supernatant of infected cultures of CC (50:1  
152 parasite:cell rate) and Vero (10:1 parasite:cell rate).

153

154 Cytotoxicity assays: non-infected CC and L929 cultures were incubated at 37°C for 24-96 h  
155 with increasing concentrations of each compound (up to 100  $\mu$ M) diluted in RPMI. Following,  
156 morphology and spontaneous contractibility were evaluated by light microscopy and cellular  
157 viability determined by the PrestoBlue (CC) and AlamarBlue (L929) tests, as standardized. The  
158 results were expressed as the difference in reduction between treated and non-treated cells  
159 accordingly to the manufacturer instructions and the value of LC<sub>50</sub> (minimum concentration  
160 that reduces in 50 % the cellular viability) was determined (Timm et al., 2014a).

161

162 Trypanocidal activity: i) BT of Y strain ( $5 \times 10^6$ /mL) were incubated for 2 and 24 h at 37°C in  
163 RPMI in the presence or absence of 1:3 serial dilutions of the compounds (0 - 50  $\mu$ M) for  
164 determination of parasite death rates through the direct quantification of live parasites by  
165 light microscopy. The EC<sub>50</sub> (minimum compound concentration that reduces 50% of the

166 number of parasites) was then calculated (Timm et al., 2014a); ii) For the analyses upon  
167 intracellular forms, *T. cruzi*-infected L929 cultures (Tulahuen strain) were incubated for 96 h  
168 at 37°C with each compound at the single concentration of 10 µM diluted in RPMI. After the  
169 incubation, 500 µM chlorophenol red glycoside (CPRG) in 0.5% Nonidet P40 was added to each  
170 well and the plate was incubated for 18 h at 37°C. The absorbance was measured at 570 and  
171 600 nm using a spectrophotometer. Controls with uninfected cells and infected cells both  
172 treated only with vehicle and/or with BZ were run in parallel for each plate. The compounds  
173 with demonstrated activity in this model were further assayed using increasing concentrations  
174 in order to determine the EC<sub>50</sub> values, as above described. Results were expressed as  
175 percentage of parasite growth inhibition by comparing the tested compound optical density  
176 data with those obtained from infected and non-treated cell cultures (Romanha et al. 2010).  
177 Next, the most promising compounds (EC<sub>50</sub> ≥ BZ) were evaluated upon intracellular  
178 amastigotes from Y and Colombiana strains using infected CC cultures (Meirelles et al., 1986).  
179 After 24 h of infection (10:1 parasite:cell rate), the cultures were treated with non toxic  
180 concentrations of the compounds for 48 h at 37°C. Following the treatment, the CC were  
181 rinsed with saline, fixed with Bouin for 5 min, stained with Giemsa and evaluated through light  
182 microscopy. The percentage of infected host cells and the number of parasites per cell were  
183 determined for the calculation of the infection index, which represents the product between  
184 the first two parameters. The EC<sub>50</sub> values were then determined (Batista et al., 2010); iii) For  
185 the analyses upon extracellular amastigotes of Y strain, the parasites were incubated  
186 (5x10<sup>6</sup>/mL) with increasing concentrations of the selected compounds for 24, 48 and 96 h and  
187 the parasite death rates were then determined through the direct quantification of the  
188 parasites by light microscopy for EC<sub>50</sub> values calculation. Selectivity index (SI) is expressed by  
189 the ratio between LC<sub>50</sub> (toxicity for mammalian cells) and the EC<sub>50</sub> (activity upon the parasite).

190

191 Reversibility assays: Tulahuen strain-infected L929 cultures were incubated in the presence of  
192 increasing concentrations of selected compounds for 6-24h and then washed and incubated  
193 with fresh culture medium for another 72 h. The absorbance was evaluated as described  
194 above. As positive control, the bis-amidine DB745 was used (Da Silva et al., 2011).

195

196 Pre-treatment effect: Non-infected L929 cultures were treated with the inhibitors in the EC<sub>50</sub>  
197 concentrations for 24h and then infected with trypomastigotes of Tulahuen strain (Leepin et  
198 al., 2008), following the protocol for analyses of optical density as mentioned above. As

199 positive control, the furamide phenyl-substituted analog DB569 was used (De Souza et al.,  
200 2004).

201

## 202 **Results**

203

204 Firstly, compounds were assayed through an automated system using L929 cell line infected  
205 by tissue-cultured trypomastigotes from the  $\beta$ -galactosidase-transfected Tulahuen strain  
206 (DTU VI), under experimental conditions that lead to infection of approximately 50% of the  
207 cells. In this model, 9 out of 17 inhibitors presented activity comparable or superior to the  
208 reference drug (Bz), exhibiting EC<sub>50</sub> values ranging 0.17-3.3  $\mu$ M, compared to  $2.7 \pm 0.4 \mu$ M for  
209 Bz. Among them, three of the most potent, VUF13527, VUF13536 and GBR11827, with EC<sub>90</sub>  
210 values about 18-fold lower than Bz one, were also the most selective, presenting low toxicity  
211 towards L929 cultures (SI = 133-599), compared to Bz (SI = 51) (**Table 2**). On the other hand,  
212 VUF14767 and VUF14768 demonstrated high toxicity profile on mammalian host cells,  
213 exhibiting LC<sub>50</sub> after 96h of  $0.85 \pm 0.42 \mu$ M and  $2 \pm 0.8 \mu$ M, respectively, leading to low  
214 selectivity (**Table 2**).

215

216 For those nine compounds that showed activity  $\leq$  BZ in this model, additional phenotypic  
217 approaches were conducted using bloodstream trypomastigotes and primary cultures of  
218 embryonic cardiomyocytes infected by Y strain of *T. cruzi*. However, in this assay only two of  
219 them were at least as active as Bz: VUF14767 and VUF14768. The second was the most potent,  
220 with an EC<sub>50</sub> value of  $0.47 \pm 0.13 \mu$ M after 24 h of incubation at 37°C, while Bz was  $12.9 \pm 1.9$   
221  $\mu$ M. VUF14768 also displayed higher SI than Bz (106 and 77, respectively; **Table 3**). However,  
222 both compounds presented high cardiotoxicity (LC<sub>50</sub> <1  $\mu$ M) after 48 h of treatment, as shown  
223 in **figure 1**, which led to low selectivity and impossibility of determining EC<sub>50</sub> values for  
224 amastigotes inside cardiac cultures (**Table 3**). In this intracellular model, it was found that  
225 VUF13526, VUF13527, VUF13536 and VUF14256 were about 3.6 – 36-fold more active than  
226 Bz, exhibiting EC<sub>50</sub> values ranging 0.1-1  $\mu$ M. VUF13527 and VUF13536 were also more  
227 selective (SI >450) than Bz (**Table 3**). VUF13527 presented the highest potency against the  
228 intracellular parasites, reaching an EC<sub>90</sub> <0.5  $\mu$ M (data not shown). In order to analyze if the  
229 high activity towards intracellular forms is extensive to DTUs naturally resistant to  
230 nitroderivatives, the Colombiana strain was used and one of the most active compounds,  
231 VUF13527, was evaluated. As observed in **table 4**, although the inhibitor is active against

232 intracellular forms in a similar concentration range, it was less potent when comparing to the  
233 Y and Tulahuen strains.

234

235 As our data demonstrated that regardless the parasite strain, the intracellular forms are more  
236 susceptible to PDE inhibitors as compared to bloodstream trypomastigotes, the effect of PDE  
237 inhibitors upon amastigotes free of host cells was next evaluated. Therefore, axenic  
238 amastigotes of Y strain were obtained from the supernatant of *T. cruzi*-infected CC (through  
239 the natural host cell lysis induced by super-infection) and Vero (trypomastigotes  
240 extracellularly differentiated to amastigotes) cultures and incubated with increasing  
241 concentrations of selected inhibitors for 24, 48 and 96h. It was observed that, while VUF13527  
242 presented an extreme reduction of activity in both models, GBR11827, VUF14767 and  
243 VUF14768 induced a reduction on the number of parasites dependent on the time exposure,  
244 reaching EC<sub>50</sub> values about 8 – 19 fold lower than Bz, ranging 0.8 – 1.9 μM after 96 h of  
245 incubation at 37°C (**Table 5**). It was also noticeable that GBR11827 exhibited a greater activity  
246 upon those parasites that went through differentiation intracellularly and was shown to be  
247 the faster acting compound, revealing, after the first 24 h, EC<sub>50</sub> value of 67 ± 18 μM. Bz also  
248 presented a time-dependent response, exhibiting EC<sub>50</sub> value of 15 ± 1 μM after 96 h of parasite  
249 incubation (**Table 5**).

250

251 Next, to rule out that the different effect of the PDE inhibitors could be due to their impact on  
252 host cell physiology, modulating their microbicidal ability against the intracellular forms of *T.*  
253 *cruzi*, pre-treatment effect was evaluated. Uninfected L929 cultures were treated for 24 h with  
254 the PDE inhibitors in the EC<sub>50</sub> corresponding values, washed and then further incubated with  
255 fresh medium in the presence of trypomastigotes of Tulahuen strain, for 96 h. Positive controls  
256 were performed in the presence of diamidine DB569. The data showed that while the pre-  
257 treatment with inhibitors prior to infection caused a maximum of 19% reduction in the  
258 infection index (for GBR11827), DB569 resulted in 85% decrease, arguing against the direct  
259 influence of inhibitors on the host cell, leading to enhanced ability to control the parasite  
260 burden (**Table 6**). This strongly suggests that the PDE inhibitors acted directly on the parasites  
261 rather than indirectly through actions on the host cells.

262

263 Additionally, aiming to evaluate the reversibility profile of the PDE inhibitors, *T. cruzi*-infected  
264 L929 cultures (Tulahuen strain) were treated with selected compounds and after 6, 12 and 24

265 h, the cultures were washed with fresh culture medium and then further incubated for  
266 another 72 h. A positive control was performed by treating the cultures with the bis-amidine  
267 DB745, considered a fast killer (Da Silva et al., 2011). By comparing the data from this assay  
268 with those from 96h of treatment, it is possible to observe that GBR11827 acts faster than  
269 VUF13527, exhibiting, after 6 h of exposure, EC<sub>50</sub> values of 3.28 and >5 μM, respectively (**Table**  
270 **7**). The inhibitors appear to have an irreversible effect, since after only 24 hours of incubation,  
271 VUF13527, GBR11827 and VUF13536 have a sustained and considerable trypanocidal effect  
272 compared to the 96 hours treatment, as shown in **table 7**.

273

## 274 **Discussion**

275

276 Phenotypic screening plays an essential role in the identification of novel active compounds,  
277 as proven by the numbers of the U.S. Food and Drug Administration: between 1999 and 2008,  
278 56% of first-in-class small-molecule drugs approved were discovered using phenotypic  
279 screening methods, while 34% were originated from target-based approaches (Blaazer et al.,  
280 2015), one of the main concepts in drug discovery. Going against Paul Ehrlich's 'magic bullet'  
281 concept, the analyzing of host and parasite highly conserved enzymes has been proposed,  
282 especially those that are already explored as pharmacological targets (Seebeck et al., 2011).  
283 This strategy, which can be clearly applied to PDE inhibitors, offers advantages such as shorter  
284 development cycle, reduced cost and less uncertainty about safety and pharmacokinetic  
285 profile (Khanna, 2012).

286

287 In kinetoplastids, differentiation and cell cycle regulation are under control of cyclic nucleotide  
288 signaling (Wang et al., 2012). The PDE activity is also involved in osmotic regulation after  
289 hyposmotic shock and disruption of this pathway has been shown to eliminate the infection  
290 by *Trypanosoma brucei* in vivo (Oberholzer et al., 2007; Schoijet et al., 2011). The first  
291 demonstration of PDE activity in lysates of blood forms of *T. brucei gambiense* occurred more  
292 than forty years ago (Walter 1974) and more recently, studies using parasites knockdown for  
293 the family of TbrPDEB showed that they are essential for this evolutive form, suggesting that  
294 a fine regulation of cAMP is needed to maintain the parasite's fitness (Laxman & Beavo, 2007).  
295 However, our data showed different activities of most compounds according to the  
296 evolutionary stage assayed, being bloodstream trypomastigotes much lesser vulnerable to  
297 PDE inhibitors action than intracellular amastigotes (**Tables 2 and 3**). It may relate to: i)

298 another targeted PDE other than PDEB; ii) different metabolisms between the two forms; iii)  
299 different rates of absorption and/or extrusion of the compounds.

300

301 GBR11827 stands out for being active upon bloodstream trypomastigotes ( $EC_{50} = 20.5 \pm 4.5$   
302  $\mu M$ ) and one of the most effective for amastigotes, especially of Tulahuen strain ( $EC_{50} = 0.3 \pm$   
303  $0.2 \mu M$ ), and still keeping  $EC_{50}$  value in the same range as BZ upon Y strain ( $5.5 \pm 4 \mu M$  and  $3.6$   
304  $\pm 1.7 \mu M$ , respectively), together with a great selectivity ( $LC_{50} > 100 \mu M$  for both mammalian  
305 cells assayed; **Tables 2 and 3**). VUF14767 and VUF14768, in spite of presenting high activity  
306 upon trypomastigotes and amastigotes, also showed an important cardiotoxicity when  
307 incubated for 48 h, as observed in **figure 1**. It may be due to a non-selective activity, already  
308 described for another compounds belonging to this class. An example is IOTA0372, which was  
309 shown to inhibit both *T. brucei* PDEB1 and human PDE4D to the same extent (Blaazer et al.,  
310 2015). This result is partially in accordance with our studies, which demonstrated IS values  
311 ranging 1 - 19 for this compound, that was also more active upon the multiplicative form  
312 (**Tables 2 and 3**). Since *T. brucei* does not present known intracellular forms, our data suggest  
313 that the environmental may be essential to define if the inhibitor action will be lethal or not  
314 for the parasite. The differential activity phenomenon can be seen with VUF13527, which was  
315 very active on amastigotes of all strains ( $EC_{50}$  ranging 0.1 - 0.5  $\mu M$ ; **Table 4**), although it did  
316 not present activity against bloodstream trypomastigotes ( $EC_{50} > 50 \mu M$ ; **Table 3**). The  
317 effectiveness of this class upon intracellular forms was also observed in a study of King Keller  
318 et al. (2010), which evaluated PDE inhibitors selected by *in silico* screening and obtained  $EC_{50}$   
319 values ranging 1.6 - 7.7  $\mu M$  on Y strain-infected myoblasts, pointing out yet that those that  
320 showed less activity upon the human enzyme exhibited higher affinity for *T. cruzi* PDEC (King-  
321 Keller et al., 2010).

322

323 In order to evaluate if the activity upon intracellular forms was due to some effect on the host  
324 cell, axenic amastigotes obtained from infected cardiac cells supernatant were incubated for  
325 different periods of time in the presence of increasing concentrations of selected inhibitors.  
326 As shown in **table 5**, GBR11827 was more active than BZ even in shorter times of incubation,  
327 showing  $EC_{50}$  value = 60.7  $\mu M$  after 24 h. Excepting VUF13527, all tested compounds kept  
328 their good activities, suggesting that the effect is more related to parasite metabolism than to  
329 a possible modulation of host cell. To exclude definitely this possibility, especially for  
330 VUF13527, non-infected L929 cultures were treated 24h prior infection with Tulahuen strain.



331 Although an inhibition of 19% in the infection index was found for BS9538, it is eclipsed by the  
332 positive control, the diamidine DB569, which showed a reduction of 85% (**Table 6**). It was also  
333 observed for other derivative of this class, the DB750, which showed a significant decrease in  
334 *Neospora caninum* proliferation after exposure of human foreskin fibroblast cultures to 1.7  
335  $\mu\text{M}$  of the compound for 6, 12, or 24 h prior infection (Leepin et al., 2008). The authors  
336 suggested that either these compounds or active metabolites were still present after the wash  
337 out or the treatment impaired some function or structure of host cell that were essential for  
338 parasite proliferation and survival.

339

340 Assays using shorter times (**Table 7**) revealed that the selected compounds have irreversible  
341 effects, especially GBR11827, which already shows activity with only 6 h of treatment on  
342 Tulahuen strain. Note that this molecule has a quick trypanocidal action profile, which is a  
343 desirable feature for emergency interventions, such as reactivation in immunocompromised  
344 patients. The positive control, DB745, was used for its well-known fast activity upon different  
345 strains of *T. cruzi* (Da Silva et al., 2011), confirmed in the present study ( $\text{EC}_{50} = 0.04 \mu\text{M}$  after  
346 6h).

347

348 Human isoforms of PDE enjoy a long history as drug targets and several inhibitors already on  
349 the market are used of for a wide spectrum of clinical conditions, such as intermittent  
350 claudication, chronic obstructive pulmonary disease and erectile dysfunction. Hence,  
351 extensive experience in screening these class of compounds is available and must be used to  
352 develop parasite-selective inhibitors. Issues related to the specificity can be overcome by using  
353 the knowledge of medicinal chemistry combined with new structural information about the  
354 catalytic domain of the enzyme (Wang et al. 2007). This know-how and technology  
355 reallocation together with the new collaborative drug discovery approach provide new  
356 opportunities to couple the curiosity-driven research culture in academia with stringent  
357 preclinical practices used in industry (Dahlin et al., 2015).

358

## 359 **Conclusions**

360

361 Our data demonstrate that most PDE inhibitors presently studied are more active against  
362 intracellular forms than upon bloodstream trypomastigotes of *T. cruzi*. The activity against  
363 amastigotes was noticed with the different DTUs studied, being the Colombiana strain less

364 susceptible as compared to Y and Tulahuen strains. Another interesting point is that the effect  
365 of PDE inhibitors against those extracellular amastigotes collected directly from the  
366 supernatant of cardiac cells cultures behaved in a closer pattern as those localized inside the  
367 mammalian hosts, suggestive of a form-dependent activity that merits investigation in order  
368 to deepen the knowledge about cyclic nucleotide pathways in trypanosomatids.

369

370

## 371 **References**

372

373 Azevedo MF, Faucz FR, Bimpaki E, Horvath A, Levy I, de Alexandre RB, Ahmad F, Manganiello  
374 V, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocr Rev.*  
375 2014 Apr;35(2):195-233.

376

377 Batista DG, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, Junqueira A,  
378 Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MNC. Arylimidamide  
379 DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob*  
380 *Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):2940-52.

381

382 Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015 Jul 30;373(5):456-66.

383

384 Blaazer AR, Orrling KM, Shanmugham A, Jansen C, Maes L, Edink E, Sterk GJ, Siderius M,  
385 England P, Bailey D, de Esch IJ, Leurs R. Fragment-based screening in tandem with phenotypic  
386 screening provides novel antiparasitic hits. *J Biomol Screen.* 2015 Jan;20(1):131-40.

387

388 Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, Van Voorhis WC. Efficient technique for screening  
389 drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase.  
390 *Antimicrob Agents Chemother.* 1996 Nov;40(11):2592-7.

391

392 CDC Homepage, 2015. Available at <http://www.cdc.gov/>

393

394 Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen.* 2015  
395 Jan;20(1):22-35.

396

397 Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral  
398 transmissions--a comprehensive review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 May;110(3):277-82.  
399

400 Da Silva CF, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Som P, Boykin  
401 DW, Soeiro MN. In vitro trypanocidal activity of DB745B and other novel arylimidamides  
402 against *Trypanosoma cruzi*. J Antimicrob Chemother. 2011 Jun;66(6):1295-7.  
403

404 Dahlin JL, Inglese J, Walters MA. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery. Nat Rev  
405 Drug Discov. 2015 Apr;14(4):279-94.  
406

407 De Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, Wilson WD, Hu Q, Boykin DW, Batista MM, Araújo-Jorge TC,  
408 Soeiro MN. Phenyl substitution of furamide markedly potentiates its anti-parasitic activity  
409 against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. Biochem Pharmacol. 2004 Aug  
410 15;68(4):593-600.  
411

412 DNDi Homepage, 2015. Available at <http://www.dndi.org/>  
413

414 Goldman M. The innovative medicines initiative: a European response to the innovation  
415 challenge. Clin Pharmacol Ther. 2012 Mar;91(3):418-25.  
416

417 Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. Drug  
418 Discov Today. 2012 Oct;17(19-20):1088-102.  
419

420 King-Keller S, Li M, Smith A, Zheng S, Kaur G, Yang X, Wang B, Docampo R. Chemical validation  
421 of phosphodiesterase C as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi*, the etiological  
422 agent of Chagas' disease. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Sep;54(9):3738-45.  
423

424 Laxman S, Beavo JA. Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets  
425 for therapeutic agents. Mol Interv. 2007 Aug;7(4):203-15.  
426

427 Leepin A, Stüdl A, Brun R, Stephens CE, Boykin DW, Hemphill A. Host cells participate in the  
428 in vitro effects of novel diamidine analogues against tachyzoites of the intracellular

429 apicomplexan parasites *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents*  
430 *Chemother.* 2008 Jun;52(6):1999-2008.

431

432 Maguire JH. Treatment of Chagas' Disease - Time Is Running Out. *N Engl J Med.* 2015  
433 Oct;373(14):1369-70.

434

435 Martin-Plaza J, Chatelain E. Novel therapeutic approaches for neglected infectious diseases. *J*  
436 *Biomol Screen.* 2015 Jan;20(1):3-5.

437

438 Meirelles MN, de Araujo-Jorge TC, Miranda CF, de Souza W, Barbosa HS. Interaction of  
439 *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of  
440 endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *Eur J Cell Biol.* 1986  
441 Aug;41(2):198-206.

442

443 Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. The use of posaconazole against Chagas disease.  
444 *Curr Opin Infect Dis.* 2015 Oct;28(5):397-407.

445

446 Nobel Prize Homepage. Available at <http://www.nobelprize.org/>

447

448 Nwaka S, Hudson A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases. *Nat Rev Drug*  
449 *Discov.* 2006 Nov;5(11):941-55.

450

451 Oberholzer M, Marti G, Baresic M, Kunz S, Hemphill A, Seebeck T. The *Trypanosoma brucei*  
452 cAMP phosphodiesterases TbrPDEB1 and TbrPDEB2: flagellar enzymes that are essential for  
453 parasite virulence. *FASEB J.* 2007 Mar;21(3):720-31.

454

455 PDE4NPD Homepage. Available at <http://www.pde4npd.eu/>

456

457 Romanha AJ, Castro SL, Soeiro MNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, Bourdin B, Blum B,  
458 Olivieri B, Zani C, Spadafora C, Chiari E, Chatelain E, Chaves G, Calzada JE, Bustamante JM,  
459 Freitas-Junior LH, Romero LI, Bahia MT, Lotrowska M, Soares M, Andrade SG, Armstrong T,  
460 Degraeve W, Andrade ZA. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and  
461 development for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010 Mar;105(2):233-8.

462

463 Schoijet AC, Miranda K, Medeiros LC, de Souza W, Flawiá MM, Torres HN, Pignataro OP,  
464 Docampo R, Alonso GD. Defining the role of a FYVE domain in the localization and activity of  
465 a cAMP phosphodiesterase implicated in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol*  
466 *Microbiol.* 2011 Jan;79(1):50-62.

467

468 Seebeck T, Sterk GJ, Ke H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan  
469 drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite.  
470 *Future Med Chem.* 2011 Aug;3(10):1289-306.

471

472 TI Pharma Homepage. Available at <http://www.tipharma.com/>

473

474 Timm BL, da Silva PB, Batista MM, da Silva FH, da Silva CF, Tidwell RR, Patrick DA, Jones SK,  
475 Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro MNC. In vitro and in vivo biological effects of novel  
476 arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014  
477 Jul;58(7):3720-6.

478

479 Walter, RD. 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase from *Trypanosoma gambiense*. *Hoppe Seylers*  
480 *Z. Physiol. Chem.* 1974. 355, 1443–1450.

481

482 Wang H, Yan Z, Geng J, Kunz S, Seebeck T, Ke H. Crystal structure of the *Leishmania major*  
483 phosphodiesterase LmjPDEB1 and insight into the design of the parasite-selective inhibitors.  
484 *Mol Microbiol.* 2007 Nov;66(4):1029-38.

485

486 Wang H, Kunz S, Chen G, Seebeck T, Wan Y, Robinson H, Martinelli S, Ke H. Biological and  
487 structural characterization of *Trypanosoma cruzi* phosphodiesterase C and Implications for  
488 design of parasite selective inhibitors. *J Biol Chem.* 2012 Apr 6;287(15):11788-97.

489

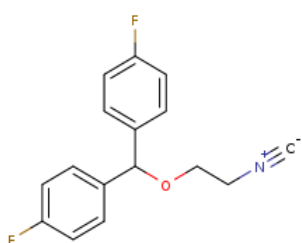
490 Woodring JL, Pollastri MP. *Phosphodiesterases and Their Inhibitors*, First Edition, 2014. Cap  
491 12, pag 191-209.

492

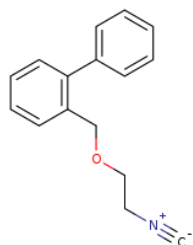
493 Zoraghi R., Seebeck T. The cAMP-Specific Phosphodiesterase TbPDE2C Is an Essential Enzyme  
494 in Bloodstream Form *Trypanosoma brucei*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002, 99, 4343–4348.

Table 1: PDE inhibitors

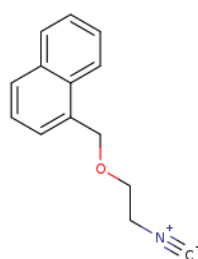
Supplier	ID	MW
VU	VUF11848	420.55
VU	VUF13522	503.64
VU	VUF13526	391.51
VU	VUF13527	337.42
VU	VUF13536	606.31
VU	VUF14256	323.16
VU	VUF14656	584.72
VU	VUF14703	529.64
VU	VUF14767	237.30
VU	VUF14768	211.26
VU	VUF14852	503.62
VU	VUF14907	377.47
VU	VUF14975	373.39
VU	VUFH1601	333.86
VU	GBR11827	273.28
VU	BS9538	407.41
VU	IOTA0372	326.17



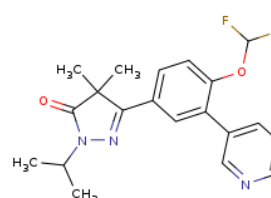
GBR11827



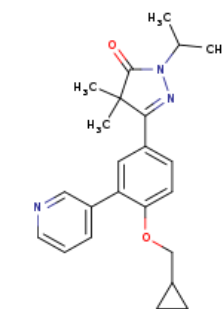
VUF14767



VUF14768



VUF14975



VUF14907

Table 2: Activity ( $\mu\text{M}$ ) of PDE inhibitors against intracellular amastigotes from  $\beta$ -galactosidase-transfected Tulahuen strain of *T. cruzi*

Inhibitor	Activity ( $\mu\text{M}$ ) Mean $\pm$ SD		Selectivity
	EC <sub>50</sub>	EC <sub>90</sub>	SI (96h)
VUF11848	>10	>10	>20
VUF13522	>10	>10	>20
VUF13526	3.3 $\pm$ 2.1	>5	11
VUF13527	0.36 $\pm$ 0.32	2	278
VUF13536	0.17 $\pm$ 0.1	0.61 $\pm$ 0.03	599
VUFH1601	>5	>5	20
VUF14256	2.62 $\pm$ 1.9	>5	38
VUF14656	>10	>10	<2.1
VUF14703	>10	>10	<2.8
VUF14767	0.7 $\pm$ 0.5	0.8 $\pm$ 0.4	1.2
VUF14768	1.4 $\pm$ 0.8	2 $\pm$ 0.6	1.4
VUF14852	9.4 $\pm$ 0.9	>10	3
VUF14907	3.3 $\pm$ 1.6	>10	17
VUF14975	2.3 $\pm$ 0.4	>10	51
GBR11827	0.3 $\pm$ 0.2	1.5 $\pm$ 0.35	133
BS9538	>5	>5	<20
IOTA0372	>2.5	>5	<19
Bz	2.7 $\pm$ 0.4	11 $\pm$ 1.8	51

Table 3: Activity ( $\mu\text{M}$ ) of PDE inhibitors against bloodstream trypomastigotes and intracellular amastigotes from Y strain of *T. cruzi*

Inhibitor	Bloodstream trypomastigotes		Intracellular amastigotes	
	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) Mean $\pm$ SD	IS (24 h)	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ ) Mean $\pm$ SD	IS (48 h)
VUF13526	>50	1	$0.7 \pm 0.5$	>77
VUF13527	>50	1	$0.1 \pm 0.03$	>476
VUF13536	>50	1	$0.1 \pm 0.01$	>455
VUF14256	$40.7 \pm 3.2$	1.2	$1 \pm 0.4$	>48
GBR11827	$20.5 \pm 4.5$	2.4	$5.5 \pm 4$	>7.3
VUF14767	$4.5 \pm 5.4$	>22	>0.31	<3
VUF14768	$0.47 \pm 0.13$	>213	>0.31	<3
VUF14907	ND	ND	ND	ND
VUF14975	>50	>1.6	ND	ND
Bz	$12.9 \pm 1.9$	77	$3.6 \pm 1.7$	277



Table 4: Comparative activity ( $\mu\text{M}$ ) of VUF13527 against intracellular amastigotes from different strains of *T. cruzi*

<i>T. cruzi</i> strains	Activity ( $\mu\text{M}$ ) Mean $\pm$ SD	IS
Colombiana (DTU I)	0.5 $\pm$ 0.03	>95
Y (DTU II)	0.1 $\pm$ 0.03	>476
Tulahuen (DTU IV)	0.36 $\pm$ 0.32	>278

Table 5: Activity ( $\mu\text{M}$ ) of PDE inhibitors against extracellular amastigotes from Y strain of *T. cruzi* obtained from supernatant of cardiac cells and Vero cultures

Inhibitor	Activity ( $\mu\text{M}$ ) Mean $\pm$ SD					
	24 h		48 h		96 h	
	CC	Vero	CC	Vero	CC	Vero
VUF13527	>100	>5	>100	>5	>100	>5
GBR11827	67 $\pm$ 18	>5	8.3 $\pm$ 9.7	>5	0.8 $\pm$ 0.01	>5
VUF14767	>100	ND	5.2 $\pm$ 8.7	ND	1.9 $\pm$ 0.9	ND
VUF14768	>100	ND	9.2 $\pm$ 15.6	ND	1.2 $\pm$ 1.1	ND
Bz	>100	>100	35.6 $\pm$ 11.4	65	15.2 $\pm$ 1.1	17

Table 6: Effect (%) of pre-treatment of non-infected L929 cell lines in the inhibition of infection with  $\beta$ -galactosidase-transfected Tulahuen strain of *T. cruzi*

<b>Inhibitor</b>	<b>% Reduction of L929 infection</b>
VUF13526	10 $\pm$ 4
VUF13527	10 $\pm$ 8
VUF13536	6 $\pm$ 4
VUF14256	8 $\pm$ 3
GBR11827	19 $\pm$ 4
BS9538	10 $\pm$ 4
IOTA0372	12 $\pm$ 5
VUFH1601	0 $\pm$ 0
Bz	9 $\pm$ 3
DB569	85 $\pm$ 14

Table 7: Comparative activity ( $\mu\text{M}$ ) of PDE inhibitors against intracellular amastigotes from  $\beta$ -galactosidase-transfected Tulahuen strain of *T. cruzi* treated for 6-96 h

Compound	$\text{EC}_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )			
	6 h	12 h	24 h	96 h
VUF13527	>5	>5	$1.9 \pm 1.7$	$0.36 \pm 0.32$
GBR11827	$3.28 \pm 0.9$	$4.6 \pm 0.25$	$0.6 \pm 0.4$	$0.3 \pm 0.2$
VUF13536	n.d.	n.d.	$0.4 \pm 0.04$	$0.17 \pm 0.1$
DB745	$0.04 \pm 0$	$0.04 \pm 0$	n.d.	n.d.

## 4 DISCUSSÃO

Recentemente, foram divulgadas as falhas terapêuticas de dois triazoles inibidores da CYP51 avaliados em ensaios clínicos da fase crônica da DC (Chatelein, 2014; Molina et al., 2015), além dos dados publicados no estudo BENEFIT, que revelaram falta de correlação entre terapia de portadores crônicos com BZ e proteção contra evolução da cardiomiopatia (Maguire, 2015). O conjunto destes ensaios, mais uma vez, reforça a importância e urgência de identificação de novas alternativas terapêuticas para DC através de projetos translacionais e multidisciplinares como aqueles desenvolvidos pelos Drs. William Campbell e Satoshi Omura e pela Dra. Youyou Tu, cujos estudos de novos tratamentos contra oncocercose, filariose e malária compartilharam o prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia de 2015 (Nobel Prize Homepage, 2015).

O reconhecimento de sequências ricas em AT na fenda menor do DNA (e do kDNA) pelas DAs clássicas como a pentamidina tem conduzido a uma estratégia otimizada de desenho racional de novos compostos estruturalmente relacionados com potencial antiparasitário (Wilson et al., 2008; Banerjee et al., 2012). As AIAs têm se mostrado ativas sobre os mais variados parasitos, em especial patógenos intracelulares incluindo *T. cruzi* (Silva et al., 2007a; Silva et al., 2007b; Rosypal et al., 2008; Pacheco et al., 2009; Mdachi et al., 2009; Batista et al., 2010; Da Silva et al., 2012; Timm et al., 2014a), *Leishmania* sp. (Wang et al., 2010; Zhu et al., 2012; Banerjee et al., 2012), *Neospora caninum* (Debache et al., 2011), *Besnoitia besoniti* (Cortes et al., 2011), *Toxoplasma gondii* (Leepin et al., 2008) e *Echinococcus multilocularis* (Stadelmann et al., 2011).

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam esta excelente atividade sobre o *T. cruzi* e sugerem que a presença de dois grupamentos catiônicos terminais promove eficácia reduzindo toxicidade de compostos amidínicos, como já anteriormente apontado para as DAs (Pacheco et al., 2009). Apesar de alguns grupos apresentarem a hipótese de que essa mudança estrutural possa facilitar a interação com o kDNA do parasito, um estudo conduzido com quatro diamidinas (DB75, DB569, DB1345 e DB829) e oito arilimidamidas (DB766, DB749, DB889, DB709, DB613, DB1831, DB1852 e DB2002), utilizando abordagens como desnaturação térmica e dicroísmo circular, mostrou que a eficácia destes compostos não está necessariamente relacionada a força de ligação ao kDNA mas de modo importante na alteração topológica da molécula (Daliry et al., 2011). Nosso grupo

também observou que apesar de haver superior acúmulo de vários destes compostos no kDNA do *T. cruzi* em relação ao núcleo, não há correlação direta entre esta localização preferencial e efeito tripanocida, e que alguns deles também se localizam em organelas desprovidas de DNA, como acidocalcisomas. Estes dados apontam que além de atuarem sobre moléculas ricas em DNA, estes compostos possam agir de modo primário ou mesmo secundário através de outros mecanismos, como desorganização dos microtúbulos e de membranas celulares e indução de lesões mitocondriais pela sua depolarização (Batista et al., 2010b).

Além da busca por novas entidades farmacológicas, outra importante demanda refere-se a alternativas para profilaxia de bancos de sangue. Em alguns países, como Bolívia e México, as taxas de infecção pelo *T. cruzi* são tão altas que os centros de hemoterapia não podem descartar o sangue dos doadores soropositivos, uma vez que isto resultaria em carência dos suprimentos para os hospitais (revisto em Coura & Albajar Viñas, 2010). Contudo, o único fármaco de referência disponível para este tipo de terapia é o corante trifenilmetano violeta de genciana (VG), que apresenta alguns fatores limitantes, como a coloração azulada/púrpura do sangue e, como consequência, das mucosas do paciente que o recebe, além do longo tempo de incubação (Morello, 1998). Dados experimentais revelam ainda o potencial efeito mutagênico em modelos de genotoxicidade sobre bactérias e células de mamífero (Aidoo et al., 1990). Desta forma, os dados que revelam que as bis-AIAs DB1967, DB1968 e DB1989 permanecem cerca de oito vezes mais ativa do que a VG em presença de sangue (96%) a 4°C têm extrema importância na profilaxia de hemoderivados e merece ser mais exploradas.

Outro aspecto a ser precocemente avaliado num programa de descoberta de novos fármacos diz respeito a seu perfil de segurança, altamente relevante para a definição de compostos “hit” e líderes (**Tabela 2**). De fato, sabe-se que mutações pontuais resultam em várias doenças genéticas humanas e o teste de reversão de mutação, ou teste de Ames, é capaz de detectar este tipo de evento através da restauração do fenótipo de síntese natural do aminoácido histidina (OECD, 1997). Esta metodologia utiliza cepas da bactéria *Salmonella enterica* Typhimurim, derivadas da linhagem LT1 e cada cepa apresenta uma mutação específica no *operon* de síntese da histidina, de forma a aumentar a sensibilidade para detectar certos tipos de mutações. A linhagem TA97, que possui mutações nos *loci* *hisD6610* e *hisO1242*, detecta mutações do tipo mudança no quadro de leitura por deleção de pares de bases GC, enquanto a TA98, que possui mutação no *locus* *hisD3052*,

detecta a adição destes pares. Já a cepa TA100 possui uma mutação no *locus hisG46* e detecta mutações por substituição de pares, levando à troca de uma prolina (GGG/CCC) por uma leucina (GAG/CTC). Diferentemente das anteriores, a cepa TA102 possui uma mutação plasmidial no *locus hisG428*, detectando mutações por substituição de pares de bases causadas por estresse oxidativo. A presença do plasmídeo pKM101 confere resistência ao antibiótico ampicilina a todas as linhagens listadas e aumenta a sensibilidade para a detecção de substâncias mutagênicas por elevar a atividade da via de reparo de DNA propensa a erros. Além disso, a cepa TA102 contém cópias múltiplas do plasmídeo pAQ1, que confere resistência ao antibiótico tetraciclina e eleva os sítios-alvo de substituições mutagênicas (Maron & Ames, 1983; Mortelmans & Zeiger, 2000). O teste pode ser feito, ainda, na presença de metabolização exógena, com a utilização da fração S9 (Molecular Toxicology Inc., Moltox™, EUA) durante a pré-incubação. Ela é preparada a partir de fígados de ratos machos Sprague-Dawley tratados com Aroclor 1254 (bifenil-policlorinado), um composto indutor da síntese de enzimas do complexo P450, em especial CYP1A e CYP2B. Isto pode resultar tanto num aumento ou diminuição na toxicidade do composto, dependendo da substância-teste (Zeiger et al., 1979).

No primeiro estudo, selecionamos uma das bis-AIAs mais ativas para explorar o potencial mutagênico pelo teste de AMES. Observamos que a DB1989 induziu um fraco potencial mutagênico sobre a cepa TA98, indicando que o dano possa ser devido à adição de pares de base GC. É importante ressaltar que a alta atividade de DB1989 sobre as cepas bacterianas impediu que o teste fosse realizado utilizando concentrações superiores a 17,7 nM, evitando mascarar o potencial mutagênico. Desta forma, estudos toxicológicos mais detalhados se fazem necessários, visando descartar tal efeito. No entanto, nossos dados corroboram ensaios anteriores realizados com as bis-AIAs DB745 e DB766 que revelaram ausência de sinais mutagênicos sobre as cepas TA98 e TA100, tanto em presença como em ausência de metabolização exógena (Wang et al., 2010).

**Tabela 2:** Critérios e parâmetros utilizados na definição e seleção de compostos “Hit” e Líderes (Adaptado de Don & Ioset, 2013)

<b>Critério</b>	<b>Parâmetro</b>	<b>Composto “Hit”</b>	<b>Composto Líder</b>
Eficácia	Atividade ( <i>in vitro</i> )	EC50 ≤ 10µM sobre amastigotas intracelulares	EC50 10-20x > que o do “hit”
	Seletividade ( <i>in vitro</i> )	10 vezes mais ativo vs. células de mamíferos	Maior que o “hit” (ideal: ≥50x) vs. células de mamíferos
	<i>In vivo</i>	NA	Redução de 80-100% na parasitemia ao final do tratamento e aumento da sobrevivência
DPMK <i>in silico</i>	Regras de Lipinski	Priorizar “hits”, não devendo ser utilizado como critério de seleção definitivo	Priorizar “hits”, não devendo ser utilizado como critério de seleção definitivo
Toxicidade	Alertas estruturais ( <i>in silico</i> )	Proceder com cautela, testando o mais cedo possível para determinar a extensão do problema percebido	NA
	<i>In vitro</i>	NA	Ensaio relevante (genotoxicidade, cardiotoxicidade, etc.)
	<i>In vivo</i>	NA	Não ser tóxico para camundongos em dose única
Perfil químico	Rotas sintéticas favoráveis	Via sintética aceitável para o composto e/ou análogos deste (<8 passos)	Não há potenciais impedimentos à síntese em escala

O BZ, como exposto no **Anexo I**, mostrou-se tóxico sobre a cepa TA100 em presença de metabolização exógena, mas como os valores não foram lineares, as concentrações são consideradas não tóxicas. Em relação à mutagenicidade, não foram observadas concentrações mutagênicas (até 1000 nM) em nenhuma das condições testadas, refutando os resultados encontrados nos trabalhos de Ferreira & Ferreira (1986b) e Ferreira et al. (1988a), que revelaram perfis de mutagenicidade e citotoxicidade sobre cepas TA100 e TA100NR, em presença ou não de fração S9. Como a violeta de genciana é utilizada como controle positivo no teste qualitativo que precede o ensaio de Ames justamente por sua conhecida atividade bactericida,



optou-se, então, pelo uso do paracetamol como controle comparativo de outro fármaco liberado, pela sua ampla utilização por sua ação analgésica e antipirética. Nossos dados (**Anexo II**) não revelaram atividade mutagênica ou citotóxica em nenhuma das concentrações e condições testadas, estando condizentes com dois trabalhos de repercussão mundial publicados na década de 1990 (Rannug et al., 1995; Bergman et al., 1996) que, após análise aprofundada e realização de testes de toxicidade em diversos modelos animais, concluíram que o fármaco só apresenta atividade mutagênica quando administrado em doses-limite e não dentro da faixa terapêutica. Os dados de controles positivos estão compilados no **Anexo III** deste trabalho.

Quanto à eficácia *in vivo* das bis-AIAs selecionadas, nossos dados demonstraram que apesar da redução significativa da parasitemia no 8º dpi, nem a DB1967 (**Anexo IV**) nem a DB1989 foram capazes de impedir a perda de peso e a mortalidade induzidas pela infecção aguda no modelo murino, diferentemente do que já foi descrito para outras bis-AIAs, como a DB766 (Batista et al., 2010) e a DB1965 (Da Silva et al., 2012). Os valores observados na curva ponderal sugerem que a alta mortalidade possa estar associada ao comprometimento clínico geral dos animais tratados com a DB1989, em especial pela caquexia observada nos animais infectados e tratados, diferentemente do que foi observado no grupo tratado com BZ, que foi capaz de recuperar o peso e atingir 100% de sobrevivência. Existe, ainda, a possibilidade de potenciais efeitos tóxicos das bis-AIAs estudadas ou de seus metabólitos, uma vez que a mortalidade foi maior no grupo tratado com a dose de 50 mg/kg/dia em relação ao grupo infectado e não-tratado. É interessante destacar que todas as bis-AIAs testadas têm grupos alcóxi aproximadamente do mesmo tamanho e apresentaram atividade *in vitro* semelhante (valores de EC50 de  $\leq 0.1 \mu\text{M}$ ). A DB1967, com apenas um grupo 2-propoxi, tem essencialmente a mesma atividade da DB766 (Batista et al., 2010), que apresenta dois destes grupamentos. Contudo, a DB1967 foi mais tóxica para os animais (até 100% de mortalidade), sugerindo que a presença de dois grupos alcóxi de tamanho moderado poderia reduzir a toxicidade *in vivo*. Para futuros ensaios, uma opção seria a terapia combinada com o BZ, que permitiria uma redução na dose de ambos e, conseqüentemente, da toxicidade sobre os animais e bem como a otimização das bis-AIAs mais ativas *in vivo* visando promover um perfil de maior segurança.

Mais recentemente, a ideia da utilização de alvos altamente conservados entre as espécies e já muito explorados na clínica para outras patologias tem

ganhado força. Assim, a partir de pequenas modificações na estrutura química de moléculas já estudadas para isoformas humanas, é possível prover maior seletividade e até mesmo novos usos terapêuticos, como, por exemplo, para terapia de DTNs (De Koning et al., 2012). Neste contexto, destacam-se os inibidores de PDEs, compostos também avaliados no presente trabalho.

Diferentes grupos de parasitologistas já vêm avaliando o potencial de aplicação de inibidores de PDE como alvo de terapia de diferentes agentes, incluindo o *T. cruzi* (Woodring & Pollastri, 2014). A primeira demonstração da atividade de PDE em lisados de formas de sangue de *T. brucei gambiense* ocorreu há mais de quarenta anos (Walter 1974) e, na última década, estudos utilizando parasitos “knockdown” para a família de TbrPDEB mostraram que elas são essenciais para esta forma evolutiva, sugerindo que uma boa regulação de cAMP é necessária para manutenção do “fitness” do parasito (Laxman & Beavo, 2007). Contudo, nossos dados em *T. cruzi* mostraram que as formas sanguíneas foram menos sensíveis aos inibidores testados até o momento, quando comparadas às intracelulares, sugerindo que i) possa haver níveis de expressão diferenciados entre estas formas; ii) diferentes metabolismos e impacto sobre distintas estruturas celulares (ex. elementos envolvidos no ciclo celular), iii) distintas taxas de absorção e extrusão dos compostos, entre outras hipóteses que merecem ser investigadas.

A eficácia superior sobre amastigotas também foi observada em estudo de King-Keller e colaboradores (2010), no qual avaliaram uma série de inibidores de PDE4 selecionados por triagem *in silico* sobre PDEC de *T. cruzi*. Os autores observaram valores de EC<sub>50</sub> entre 1,6 µM e 7,7 µM no caso de infecção de mioblastos com a cepa Y, ressaltando, ainda, que aqueles com menor atividade sobre a enzima humana apresentavam maior afinidade por TcrPDEC. Alguns dos inibidores que estudamos, como VUF13527 e VUF13536, foram cerca de 10 vezes mais ativos que os descritos no trabalho acima citado, demonstrando o potencial dos mesmos sobre *T. cruzi*.

GBR11827 se destaca por ser o mais ativo sobre tripomastigotas sanguíneos da cepa Y (EC<sub>50</sub> = 20,5 ± 4,5 µM) e um dos mais ativos sobre as formas amastigotas da cepa Tulahuen (EC<sub>50</sub> = 0,3 ± 0,2 µM). Assim, de modo a investigar se esta diferença de ação dos compostos pudesse ter relação com as cepas estudadas (Y e Tulahuen para tripomastigota e intracelular, respectivamente), estudamos o efeito dos compostos sobre a cepa Y presente no citoplasma de cultivos de células cardíacas. Observamos que os todos os compostos mantiveram mesmo nível de

atividade sobre as formas intracelulares, exceto o GBR11827, que se revelou na mesma faixa do BZ ( $5,5 \pm 4 \mu\text{M}$  e  $3,6 \pm 1,7 \mu\text{M}$ , respectivamente). Já VUF13527 mostrou atividade na mesma faixa sobre todas as formas amastigotas das cepas Tulahuen, Y e Colombiana, com valores de  $EC_{50}$  variando entre 0,1 e 0,5  $\mu\text{M}$ . VUF14767 e VUF14768, apesar de muito ativos sobre ambas as formas, mostraram-se extremamente cardiotoxicos quando incubados a partir de 48 h. Este fenômeno poderia estar relacionado a uma atividade promiscua, já descrita para outros compostos desta classe (Blaazer et al., 2015; Ochiana et al, 2015). Um exemplo é o inibidor IOTA0372, também analisado neste trabalho, que revelou um perfil de inibição semelhante sobre as isoformas de PDEB1 de *T. brucei* e PDE4D, de humanos (Blaazer et al., 2015). Este resultado está parcialmente em concordância com os nossos dados, que demonstraram valores de IS entre 1 e 19 para este composto, que também se revelou mais ativo sobre formas intracelulares. Ensaios utilizando tempos mais curtos revelaram que os compostos selecionados possuem efeito irreversível, com destaque para GBR11827 que já mostra atividade com apenas 6 h de tratamento sobre a cepa Tulahuen. Vale destacar que esta molécula tem um perfil de ação tripanocida rápida o que representa uma característica desejável para intervenções emergenciais em quadros, por exemplo, de reativação em portadores imunocomprometidos.

Visando avaliar se a atividade diferencial observada entre as formas do parasito poderia ser consequência de efeito direto sobre a célula hospedeira, amastigotas axênicas obtidas do sobrenadante de células cardíacas e de cultivos de células Vero foram incubadas por diferentes períodos em presença de concentrações crescentes dos inibidores selecionados. Estes parasitos, embora tenham morfologia de amastigotas, foram recuperados após processos diferenciados de amastigogênese. No primeiro protocolo, utilizamos células cardíacas expostas a superinfecção (razão 50:1 parasito:célula), que induz uma precoce ruptura da membrana das células hospedeiras e liberação de amastigotas no meio extracelular, sendo estas imediatamente coletadas e ensaiadas. Já no segundo protocolo, após liberação de tripomastigotas no sobrenadante das culturas, estes parasitos foram mantidos sob estresse nutricional e de pH, resultando na diferenciação em formas “amastigotas-like”. Observamos que enquanto havia um efeito tripanocida tempo-dependente para o BZ em ambas condições e em faixas de concentrações equivalentes, no caso dos inibidores houve morte de parasitos somente quando incubados com as amastigotas que se diferenciaram

intracelularmente e que, portanto, apresentam perfil metabólico mais semelhante ao de parasitos presentes no ambiente intracelular. Neste caso, GBR11827 novamente chama atenção por ser mais ativo que o BZ mesmo em tempos mais curtos, exibindo valor de  $EC_{50} = 60,7 \mu\text{M}$  após 24 h. Com exceção de VUF13527, todos os compostos testados mantiveram sua boa atividade sobre amastigotas extracelulares obtidas a partir de células cardíacas, sugerindo que o efeito esteja mais relacionado ao metabolismo da forma evolutiva do que a uma possível modulação pela célula hospedeira. Isto foi corroborado no ensaio em que culturas de fibroblastos L929 foram tratadas por 24 h previamente à infecção com os respectivos valores de  $EC_{50}$  de cada inibidor. Apesar de uma inibição máxima de 19% no índice de infecção ter sido observada com GBR11827, isto foi eclipsado pelo controle positivo, a diamidina DB569, que mostrou redução de 85%. Outro derivado desta classe, a DB750, mostrou diminuição significativa na proliferação de *Neospora caninum* após a exposição de fibroblastos humanos à DA na concentração de  $1,7 \mu\text{M}$  por 6, 12 ou 24 h antes da infecção (Leepin et al., 2008). Os autores sugerem que o composto ou seus metabólitos poderiam estar estocados intracelularmente mesmo após a lavagem da cultura e/ou que o tratamento alterou alguma estrutura ou função da célula hospedeira ativando seu potencial microbicida reduzindo assim a sobrevivência e proliferação do parasito. Estes dados, somados às evidências sobre amastigotas extracelulares, demonstram o efeito dos inibidores sobre os parasitos e de modo diferenciado a depender da forma do parasito que está em análise.

As isoformas humanas de PDE desfrutam de um longo histórico como alvos de fármacos já liberados e amplamente utilizados, o que fornece uma vasta experiência na triagem de novos compostos que pode ser aproveitada para o desenvolvimento de inibidores para isoformas específicas do parasito. Questões relativas à especificidade podem ser contornadas usando o conhecimento da química medicinal, combinado com novas informações estruturais sobre os domínios catalíticos da enzima em tripanossomatídeos (Wang et al., 2012). Esta abordagem de realocação de “know-how” e de tecnologia pode ajudar a superar o impasse entre a necessidade médica urgente de novos medicamentos antiparasitários e os obstáculos tecnológicos e financeiros encontrados para desenvolvê-los (De Koning et al., 2012; Dahlin et al., 2015).

O presente trabalho abre portas para a avaliação mais profunda a respeito de vias de morte celular e mecanismos de ação relacionados às AIAs e aos inibidores de PDE, classes com comprovada atividade antiparasitária. O “design” inteligente de

novos compostos candidatos também está entre as perspectivas mais importantes e urgentes, bem como sua triagem através de um painel fenotípico bem estabelecido, algumas das metas de investigação na tese de doutorado.

## 5 CONCLUSÕES

- a) As arilimidamidas exibem excelente atividade sobre ambas formas tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) *in vitro*, em doses micromolares e nanomolares, sendo algumas delas mais ativas que a droga de referência (BZ);
- b) A análise do efeito dos compostos contra tripomastigotas em presença de sangue total, visando seu potencial uso em centros de hemoterapia, mostrou uma diminuição na atividade tripanocida de alguns compostos. No entanto, algumas bis-AIAs, como a DB1989, mantiveram-se cerca de 8 vezes mais ativas do que a violeta de genciana;
- c) A correlação entre atividade e estrutura química sugere que AIAs dicatiônicas sejam mais eficazes *in vitro* sobre *T. cruzi* em relação aos compostos monocatiônicos, tanto sobre formas tripomastigotas quanto sobre amastigotas, o que confirma a relevância da presença de dois grupos catiônicos terminais quanto a ação e seletividade desta classe;
- d) Ensaio de Ames conduzidos com a bis-AIA DB1989 e com os fármacos de referência BZ e paracetamol sugerem baixo e ausente potencial de mutagenicidade até as concentrações testadas;
- e) Estudos *in vivo* com as bis-AIAs DB1967 e DB1989 mostraram que, apesar da redução significativa nos níveis de parasitemia, nenhuma foi capaz de proteger contra a perda de peso corporal e a mortalidade induzidos pela infecção pelo *T. cruzi*;
- f) Os inibidores de PDE apresentam um perfil de atividade diferencial em relação à forma evolutiva avaliada, mostrando-se mais eficazes sobre as formas amastigotas (intracelulares e extracelulares) quando comparados aos tripomastigotas sanguíneos;

- g) Os compostos VUF14767 e VUF14768, apesar de bastante ativos sobre as formas extracelulares, mostraram-se extremamente cardiotoxicos, o que pode sugerir um mecanismo inespecífico;
- h) VUF13527 revelou eficácia semelhante sobre as três cepas avaliadas que apresentam diferenças no perfil de resistência aos fármacos nitroderivados utilizados na clínica e de distintos DTUs relevantes para infecção humana, como a Tulahuen (susceptível DTU VI), Y (moderadamente resistente e de DTU II) e cepa Colombiana (altamente resistente e de DTU I);
- i) Os inibidores selecionados apresentaram um efeito irreversível, com destaque para GBR11827, que com seis horas de tratamento já exibe atividade maior do que a do BZ o que demonstra sua característica de rápido agente tripanocida;
- j) A possibilidade de efeito direto sobre a célula hospedeira foi descartada pelos ensaios de pré-tratamento, que mostraram uma inibição de no máximo 19% na infecção de células L929 pela cepa Tulahuen enquanto o controle positivo (DB569) alcançou índices de 85% de redução;
- k) Análises mais profundas acerca de mecanismos de ação e vias de morte celular se fazem necessários para o melhor entendimento dos perfis de atividade e toxicidade observados para as duas classes de compostos avaliadas assim como triagens fenotípicas de novos análogos otimizados a partir deste estudo.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aidoo A, Gao N, Neft RE, Schol HM, Hass BS, Minor TY, Heflich RH. Evaluation of the genotoxicity of gentian violet in bacterial and mammalian cell systems. *Teratog Carcinog Mutagen*. 1990;10(6):449-62.
- Alonso GD, Schoijet AC, Torres HN, Flawia, MM. TcrPDEA1, a cAMP specific phosphodiesterase with atypical pharmacological properties from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol*. 2007; 152, 72–9.
- Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, Ouaiissi A. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell Death and Differentiation* 1995; 2(4):285-300.
- Andrade SG, Andrade ZA. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev Instit Medic Tropic São Paulo* 1968; 10(3): 180-7.
- Angheben A, Boix L, Buonfrate D, Gobbi F, Bisoffi Z, Pupella S, Gandini G, Aprili G. Chagas disease and transfusion medicine: a perspective from non-endemic countries. *Blood Transfus*. 2015; 13(4): 540-50.
- Ashley JN, Barber HJ, Ewins AJ, Newbery G and Self ADH. A chemotherapeutic comparison of the trypanocidal action of some aromatic diamidines. *J. Chem. Soc*. 1942; 103-16.
- Azevedo MF, Faucz FR, Bimpaki E, Horvath A, Levy I, de Alexandre RB, Ahmad F, Manganiello V, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of the phosphodiesterases (PDEs). *Endocr Rev*. 2014; 35(2):195-233.
- Banerjee M, Farahat AA, Kumar A, Wenzler T, Brun R, Munde MM, Wilson WD, Zhu X, Werbovetz KA, Boykin DW. Synthesis, DNA binding and antileishmanial activity of low molecular weight bis-arylimidamides. *Eur J Med Chem*. 2012; 55:449-54.
- Batista DG, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MNC. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic



- candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010a; 54(7):2940-52.
- Batista DGJ, Pacheco MGO, Kumar A, Branowska D, Ismail MA, Hu L, Boykin DW, Soeiro MNC. Biological, Ultrastructural Effect and Subcellular Localization of Aromatic Diamidines in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2010b; 21:1-9.
- Benaim B, Garcia CR. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. *Trop Biomed.* 2011; 28(3):471-81.
- Bergman K, Müller L, Teigen SW. Series: current issues in mutagenesis and carcinogenesis, No. 65. The genotoxicity and carcinogenicity of paracetamol: a regulatory (re)view. *Mutat Res.* 1996; Feb 1;349(2):263-88.
- Bern C. Chagas' disease. *N Engl J Med.* 2015; 373:456-66.
- Blaazer AR, Orrling KM, Shanmugham A, Jansen C, Maes L, Edink E, Sterk GJ, Siderius M, England P, Bailey D, de Esch IJ, Leurs R. Fragment-based screening in tandem with phenotypic screening provides novel antiparasitic hits. *J Biomol Screen.* 2015;20(1):131-40.
- Boiani M, Piacenza L, Hernandez P, Boiani L, Cerecetto H, Gonzalez M, Denicola A. Mode of action of nifurtimox and Noxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved? *Biochem. Pharmacol.* 2010; 79: 1736-45.
- Bonney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? *Parasite* 2014; 21, 11.
- Brener, Z.; Chiari, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop.* 1963; 5: 220-44.
- Buckner FS, Navabi N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. *Curr Opin Infect Dis.* 2010; 23(6):609-16.
- CDC Homepage [acesso em 20 nov 2015]. Disponível em <http://www.cdc.gov/>
- Chagas C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909d; v.1, n.2, p.159-218.
- Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen.* 2015; 20(1):22-35.

- Clayton J. Chagas disease 101. *Nature* 2010a; S4-5.
- Cortes HC, Muller N, Boykin D, Stephens CE, Hemphill A. *In vitro* effects of arylimidamides against *Besnoitia besnoiti* infection in Vero cells. *Parasitology* 2011; 138(5):583-92.
- Coura JR, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(1):3-24.
- Coura JR, Dias JC. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104 S1:31-40.
- Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature* 2010; 24:465(7301):S6-7.
- Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions--a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2015; 110(3):277-82.
- Da Silva CF, Batista DG, Oliveira GM, de Souza EM, Hammer ER, da Silva PB, Daliry A, Araujo JS, Britto C, Rodrigues AC, Liu Z, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro MNC. *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.
- Dahlin JL, Inglese J, Walters MA. Mitigating risk in academic preclinical drug discovery. *Nat Rev Drug Discov.* 2015; 14(4):279-94.
- 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(10):4765-73.
- De Koning HP, Gould MK, Sterk GJ, Tenor H, Kunz S, Luginbuehl E, Seebeck T. Pharmacological validation of *Trypanosoma brucei* phosphodiesterases as novel drug targets. *J Infect Dis.* 2012; 206(2):229-37.
- De Souza EM, Lansiaux A, Bailly C, Wilson WD, Hu Q, Boykin DW, Batista MM, Araújo-Jorge TC, Soeiro MNC. Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochem Pharmacol.* 2004; 68(4):593-600.

- De Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int Rev Cytol. 1984; 86:197-283.
- De Souza W, De Carvalho, TM, Barrias, ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host Cell Interaction. Int J Cell Biol. 2010; 18p.
- Debache K, Guionaud C, Kropf C, Boykin D, Stephens CE, Hemphill A. Experimental treatment of *Neospora caninum*-infected mice with the arylimidamide DB750 and the thiazolide nitazoxanide. Exp Parasitol. 2011; 129(2):95-100.
- Diaz de Toranzo EGD, Castro JA, Franke de Cazzulo BM, Cazzulo JJ. Interaction of benzonidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia 1988; 44: 880-1.
- DNDi Homepage [acesso em 20 nov 2015]. Disponível em <http://www.dndi.org/>
- Docampo R, De Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SN. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nat Rev Microbiol. 2005; 3: 251-61.
- Docampo R, Stoppani AOM. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys. 1979; 197: 317-21.
- Docampo R, Moreno SNJ. The acidocalcisome as a target for chemotherapeutic agents in protozoan parasites. Current Pharmaceutical Design 2008; 14: 882-8.
- Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. Parasitology 2014; 141(1):140-6.
- Eperon G, Balasegaram M, Potet J, Mowbray C, Valverde O, Chappuis F. Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis. Expert Rev Anti Infect Ther. 2014; 12(11):1407-17.
- Ferreira RC, Ferreira LC. Mutagenicity of nifurtimox and benznidazole in the *Salmonella*/microsome assay. Braz J Med Biol Res. 1986b; 19(1):19-25.
- Ferreira RC, Schwarz U, Ferreira LC. Activation of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes. Mutat Res. 1988a; 204(4):577-83.
- Goldman M. The innovative medicines initiative: a European response to the innovation challenge. Clin Pharmacol Ther. 2012; 91(3):418-25.

- Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem.* 2011; 286(15):13088-95.
- Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56: 115-23.
- Heikaus CC, Pandit J, Kleivit RE. Cyclic nucleotide binding GAF domains from phosphodiesterases. *Structural and mechanistic insights* 2009; S17, 1551–7.
- Jannin J, Villa L. An overview of Chagas disease treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102 Suppl 1:95-7.
- Khanna I. Drug discovery in pharmaceutical industry: productivity challenges and trends. *Drug Discov Today* 2012; 17(19-20):1088-102.
- King H, Lourie EM, Yorke W. New trypanocidal substances. *The Lancet* 1937; (230):1360-63.
- King-Keller S, Li M, Smith A, Zheng S, Kaur G, Yang X, Wang B, Docampo R. Chemical validation of phosphodiesterase C as a chemotherapeutic target in *Trypanosoma cruzi*, the etiological agent of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(9):3738-45.
- Klein N, Hurwitz I, Durvasula R. Globalization of Chagas Disease: A Growing Concern in Nonendemic Countries. *Epidem Research Intern.* 2012; Vol 2.
- Kunz S, Oberholzer M, Seebeck T. A FYVE-containing unusual cyclic nucleotide phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *FEBS J.* 2005; 272, 6412–22.
- Laxman S, Beavo JA. Cyclic nucleotide signaling mechanisms in trypanosomes: possible targets for therapeutic agents. *Mol Interv.* 2007; 7(4):203-15.
- Leepin A, Stüdl A, Brun R, Stephens CE, Boykin DW, Hemphill A. Host cells participate in the *in vitro* effects of novel diamidine analogues against tachyzoites of the intracellular apicomplexan parasites *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(6):1999-2008.
- 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. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27(4):949-79.

- Makin L, Gluenz E. cAMP signalling in trypanosomatids: role in pathogenesis and as a drug target. *Trends Parasitol.* 2015; 31(8):373-9.
- Maron DM, Ames BN. Revised Methods for the *Salmonella* Mutagenicity Test. *Mutation Res.* 1983; 113, 173-215.
- McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, Saxton T, Arkin M, Kerr ID, Brinen LS, Craik CS. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009. 104 S1:263-9.
- Mdachi RE, Thuita JK, Kagira JM, Ngotho JM, Murilla GA, Ndung'u JM, Tidwell RR, Hall JE, Brun R. Efficacy of the novel diamidine compound 2,5-Bis(4-amidinophenyl)-furan-bis-O-Methylamidoxime (Pafuramidine, DB289) against *Trypanosoma brucei rhodesiense* infection in vervet monkeys after oral administration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(3):953-7.
- Morello A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol C.* 1988; 90(1):1-12.
- Moreno SN, Mason RP, Docampo R. Reduction of nifurtimox and nitrofurantoin to free radical metabolites by rat liver mitochondria. Evidence of an outer membrane-located nitroreductase. *J. Biol. Chem.* 1984; 259: 6298-6305.
- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res.* 2000; 455(1-2):29-60.
- MSF Homepage [acesso em 21 nov 2015]. Disponível em <http://www.doctorswithoutborders.org/>
- Murta SM, Gazzinelli RT, Brener Z, Romanha AJ. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benzimidazole and nifurtimox. *Mol Biochem Parasitol.* 1998; 93(2):203-14.
- Niyogi S, Mucci J, Campetella O, Docampo R. Rab11 regulates trafficking of transsialidase to the plasma membrane through the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Pathog.* 2014; 10(6):e1004224.
- Oberholzer M, Marti G, Baresic M, Kunz S, Hemphill A, Seebeck T. The *Trypanosoma brucei* cAMP phosphodiesterases TbrPDEB1 and TbrPDEB2:

flagellar enzymes that are essential for parasite virulence. *FASEB J.* 2007; 21(3):720-31.

Ochiana SO, Bland ND, Settimo L, Campbell RK, Pollastri MP. Repurposing human PDE4 inhibitors for neglected tropical diseases. Evaluation of analogs of the human PDE4 inhibitor GSK-256066 as inhibitors of PDEB1 of *Trypanosoma brucei*. *Chem Biol Drug Des.* 2015; 85(5):549-64.

OECD. 1997. Test Guideline 471. Bacterial Reverse Mutation Test. In: OECD Guideline for Testing of Chemicals. Paris, Organization for Economic Cooperation & Development.

Olmo F, Guardia JJ, Marin C, Messouri I, Rosales MJ, Urbanová K, Chayboun I, Chahboun R, Alvarez-Manzaneda EJ, Sánchez-Moreno M. Prospects of an alternative treatment against *Trypanosoma cruzi* based on abietic acid derivatives show promising results in Balb/c mouse model. *Eur J Med Chem.* 2015; 89:683-90.

OMS. Strategic and technical meeting on intensified control of neglected tropical diseases – Report of an international workshop. Geneva: WHO, 2006.

OMS. Recommendations of an Informal Consultation meeting on Chagas Disease Control and Prevention in Europe. WHO headquarters. Geneva: WHO, 2009.

OMS/TDR. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2012.

OMS. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases - Third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva: WHO, 2015.

Pacheco MGO, Silva CF, De Souza EM, Batista MM, Silva PB, Kumar A, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro MNC. Activity of heterocyclic cationic molecules against *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Exp Parasitol.* 2009; 123:73-80.

Pays JF. No, Chagas disease is not the new AIDS of the Americas! *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 2012; 105:343-8

PDE4NPD Page [acesso em 22 nov 2015]. Disponível em <http://www.pde4npd.eu/>

Pérez-Molina JA, Perez AM, Norman FF, Monge-Maillo B, López-Vélez R. Old and new challenges in Chagas disease. *Lancet Infect Dis.* 2015; 28.

Persidis A. Systematic repositioning using MoA to map all drugs against all diseases. The Drug Repositioning Conference, San Francisco, 2012 July 13–14.

- Rannug U, Holme JA, Hongslo JK, Srám R. International Commission for Protection against Environmental Mutagens and Carcinogens. An evaluation of the genetic toxicity of paracetamol. *Mutat Res.* 1995; 327(1-2):179-200.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am.* 2012; 26(2):275-91.
- Ribeiro I, Sevcsik AM, Alves F, Diap G, Don R, Harhay MO, Chang S, Pecoul B. New, improved treatments for Chagas disease: from the R&D pipeline to the patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2009; 3(7):e484.
- Rosypal AC, Werbovets KA, Salem M, Stephens CE, Kumar A, Boykin DW, Hall JE, Tidwell RR. Inhibition by dicationic compounds of in vitro growth of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: causative agents of old world cutaneous leishmaniasis. *J Parasitol.* 2008; 94(3):743-9.
- Schoijet AC, Miranda K, Medeiros LC, de Souza W, Flawiá MM, Torres HN, Pignataro OP, Docampo R, Alonso GD. Defining the role of a FYVE domain in the localization and activity of a cAMP phosphodiesterase implicated in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Microbiol.* 2011; 79(1):50-62.
- Seebeck T, Sterk GJ, Ke H. Phosphodiesterase inhibitors as a new generation of antiprotozoan drugs: exploiting the benefit of enzymes that are highly conserved between host and parasite. *Future Med Chem.* 2011; 3(10):1289-306.
- Shikanai-Yasuda MA, Carvalho NB. Oral transmission of Chagas disease. *Clin Infect Dis.* 2012; 54(6):845-52.
- Silva CF; Meuser MB, De Souza EM, Meirelles MNL, Stephens CE, Som, P, Boykin DW, Soeiro MNC. Cellular effects of reversed amidines on *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 2007a. 51:3803-9.
- Silva CF, Batista MM, Mota RA, de Souza EM, Stephens CE, Som P, Boykin DW, Soeiro MNC. Activity of "reversed" diamidines against *Trypanosoma cruzi* "in vitro". *Biochemical Pharmacology* 2007b; 73:1939-46.
- Soeiro MNC, Werbovets K, Boykin DW, Wilson WD, Wang MZ, Hemphill A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology* 2013; 8:1-23.
- Stadelmann B, Küster T, Scholl S, Barna F, Kropf C, Keiser J, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A. In vitro efficacy of dicationic compounds and mefloquine

enantiomers against *Echinococcus multilocularis* metacestodes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10):4866-72.

Strasen J, Williams T, Ertl G, Zoller T, Stich A, Ritter O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol.* 2014; 103(1):1-10.

Surh Y. Molecular mechanisms of chemopreventive effects of selected dietary and medicinal phenolic substances. *Mutat Res.* 1999; 428(1-2):305-27.

Tagoe DNA, Kalejaiye TD, de Koning HP. The ever unfolding story of cAMP signaling in trypanosomatids: vive la difference! *Front. Pharmacol.* 2015; 6:185

TI Pharma Page [acesso em 22 nov 2015]. Disponível em <http://www.tipharma.com/>

Timm BL, da Silva PB, Batista MM, da Silva FH, da Silva CF, Tidwell RR, Patrick DA, Jones SK, Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro MNC. *In vitro* and *in vivo* biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014; 58(7):3720-6.

Walter RD. 3',5'-cyclic-AMP phosphodiesterase from *Trypanosoma gambiense*. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 1974; 355, 1443–50.

Wang H, Kunz S, Chen G, Seebeck T, Wan Y, Robinson H, Martinelli S, Ke H. Biological and structural characterization of *Trypanosoma cruzi* phosphodiesterase C and implications for design of parasite selective inhibitors. *J Biol Chem.* 2012; 287(15):11788-97.

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, Werbovetz KA. Novel arylimidamides for treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(6):2507-16.

Wilkinson SR, Taylor MC, Horn D, Kelly JM, Cheeseman I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2008; 105: 5022-27.

Wilkinson SR, Kelly JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev. Mol. Med.* 2009; 11: e31.

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



- Woodhall D, Jones JL, Cantey PT, Wilkins PP, Montgomery SP. Neglected parasitic infections: what every family physician needs to know. *Am Fam Physician* 2014; 15;89(10):803-11.
- Woodring JL, Pollastri MP. *Phosphodiesterases and Their Inhibitors*, First Edition, 2014. Cap 12, pag 191-209.
- Zhu X, Liu Q, Yang S, Parman T, Green CE, Mirsalis JC, Soeiro MNC, de Souza EM, da Silva CF, Batista DGJ, Stephens CE, Banerjee M, Farahat AA, Munde M, Wilson WD, Boykin DW, Wang MZ, Werbovetz KA. Evaluation of arylimidamides DB1955 and DB1960 as candidates against visceral leishmaniasis and Chagas' disease: in vivo efficacy, acute toxicity, pharmacokinetics, and toxicology studies. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56(7):3690-9.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012; 12(2):240-53.

## **7. ANEXOS**

**Anexo I:** Induction of His<sup>+</sup> revertants in *S. enterica* (Typhimurium strains) by BZ in reverse mutation test with and without metabolic activation

Strain	nM	-S9			+S9		
		MI <sup>a</sup>	His <sup>+</sup> ± SD <sup>b</sup>	Surv % <sup>c</sup>	MI <sup>a</sup>	His <sup>+</sup> ± SD <sup>b</sup>	Surv % <sup>c</sup>
TA97	0	1.00	79.3 ± 10.7	100.0	1.00	192.0 ± 22.7	100.0
	0.1	0.99	78.5 ± 44.5	74.5	1.05	201.3 ± 6.6	98.4
	1	0.42	33.5 ± 17.7	77.5	1.08	206.7 ± 35.8	100.0
	10	1.84	146.0 ± 7.9	84.9	1.13	217.3 ± 14.2	82.3
	100	1.80	142.5 ± 6.4	100.0	1.14	218.0 ± 45.0	100.0
	1000	1.06	84.0 ± 0.0	71.8	0.92	176.7 ± 12.7	100.0
TA98	0	1.00	18.5 ± 3.5	100.0	1.00	45.0 ± 15.6	100
	0.1	0.68	12.7 ± 1.5	100.0	0.73	32.7 ± 4.2	91.6
	1	1.23	22.7 ± 8.0	100.0	0.74	33.3 ± 9.0	92.5
	10	0.86	16.0 ± 2.6	100.0	0.74	33.3 ± 17.9	80.3
	100	1.48	27.3 ± 6.5	100.0	1.27	57.3 ± 12.2	86.5
	1000	1.26	23.3 ± 1.5	100.0	1.05	47.3 ± 7.6	100.0
TA100	0	1.00	85.3 ± 6.8	100.0	1.00	84.0 ± 5.3	100.0
	0.1	1.06	90.7 ± 7.5	100.0	0.76	64.0 ± 3.5	76.4
	1	0.95	80.7 ± 4.9	100.0	0.94	79.3 ± 21.4	<b>63.7</b>
	10	0.61	52.0 ± 10.8	100.0	0.85	71.3 ± 8.1	<b>60.9</b>
	100	0.42	36.0 ± 8.5	100.0	1.03	86.3 ± 19.6	72.8
	1000	0.80	68.0 ± 38.9	100.0	0.99	83.3 ± 13.3	<b>66.4</b>
TA102	0	1.00	358.0 ± 68.1	100.0	1.00	405.0 ± 33.0	100.0
	0.1	0.96	343.7 ± 21.7	100.0	0.94	380.0 ± 8.7	100.0
	1	1.16	416.3 ± 52.5	100.0	0.95	386.3 ± 27.1	100.0
	10	1.20	430.3 ± 91.6	100.0	0.92	373.0 ± 35.3	99.8
	100	1.28	457.7 ± 22.2	100.0	0.84	339.3 ± 3.5	100.0
	1000	1.03	369.5 ± 6.4	100.0	0.83	338.0 ± 10.5	100.0

<sup>a</sup>Mutagenic index (M.I.): number of His<sup>+</sup> induced in the sample/number of spontaneous His<sup>+</sup> in the negative control (DMSO 5%)

<sup>b</sup>Number of His<sup>+</sup>/plate: mean value ± SD of at least three experiments

<sup>c</sup>Percentage of cell survival (Surv. %) calculated in relation to the negative control

**Anexo II:** Induction of His<sup>+</sup> revertants in *S. enterica* (Typhimurium strains) by paracetamol in reverse mutation test with and without metabolic activation

	nM	His <sup>+</sup> ± DP <sup>b</sup>	MI <sup>a</sup>	Surv % <sup>c</sup>
<b>TA97</b>	0	178.7 ± 2.5	1.00	100
	1,3.10 <sup>2</sup>	161.7 ± 12.9	0.90	100
	1,3.10 <sup>3</sup>	147.7 ± 40.1	0.83	100
	1,3.10 <sup>4</sup>	148.7 ± 16.7	0.83	100
	1,3.10 <sup>5</sup>	150.7 ± 5.9	0.84	100
	1,3.10 <sup>6</sup>	175.0 ± 19.5	0.98	100
<b>TA98</b>	0	18.7 ± 10.7	1.00	100
	1,3.10 <sup>2</sup>	31.3 ± 0.6	1.68	76.2
	1,3.10 <sup>3</sup>	27.0 ± 2.6	1.45	100
	1,3.10 <sup>4</sup>	33.5 ± 6.4	1.79	100
	1,3.10 <sup>5</sup>	28.3 ± 2.1	1.52	100
	1,3.10 <sup>6</sup>	25.3 ± 6.4	1.36	100
<b>TA100</b>	0	190.0 ± 24.2	1.00	100
	1,3.10 <sup>2</sup>	208.0 ± 33.4	1.09	92,7
	1,3.10 <sup>3</sup>	211.0 ± 21.0	1.11	81,8
	1,3.10 <sup>4</sup>	202.7 ± 11.0	1.07	93,0
	1,3.10 <sup>5</sup>	194.3 ± 21.6	1.02	100
	1,3.10 <sup>6</sup>	247.3 ± 57.4	1.30	100
<b>TA102</b>	0	416.0 ± 54.9	1.00	100
	1,3.10 <sup>2</sup>	418.0 ± 97.7	1.00	100
	1,3.10 <sup>3</sup>	441.0 ± 15.6	1.06	100
	1,3.10 <sup>4</sup>	313.3 ± 13.8	0.75	100
	1,3.10 <sup>5</sup>	316.7 ± 45.6	0.76	100
	1,3.10 <sup>6</sup>	400.3 ± 44.4	0.96	100

<sup>a</sup>Mutagenic index (M.I.): number of His<sup>+</sup> induced in the sample/number of spontaneous His<sup>+</sup> in the negative control (DMSO 5%)

<sup>b</sup>Number of His<sup>+</sup>/plate: mean value ± SD of at least three experiments

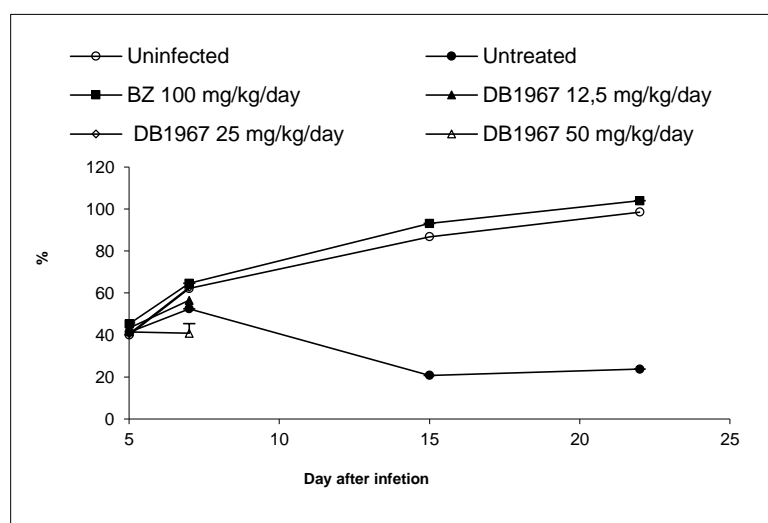
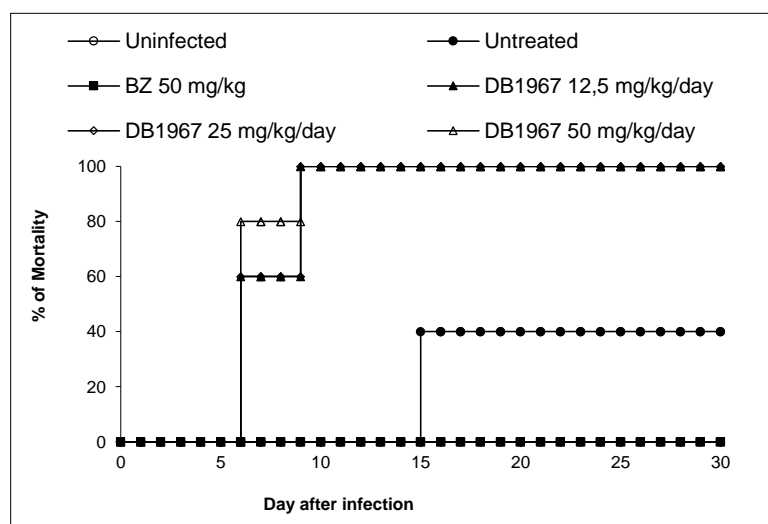
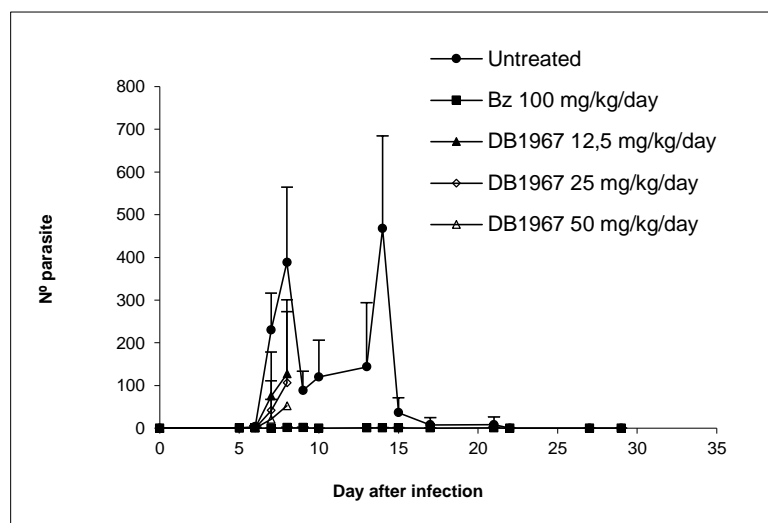
<sup>c</sup>Percentage of cell survival (Surv. %) calculated in relation to the negative control

**Anexo III: Controles positivos utilizados nos ensaios de Ames**

<b>Cepa</b>	<b>(-S9)</b>	<b>[µg/placa]</b>	<b>(+S9)</b>	<b>[µg/placa]</b>
<b>TA97</b>	4-Nitroquinolino-N-Óxido	0,5	2-Aminoantraceno	1-5
<b>TA98</b>	4-Nitroquinolino-N-Óxido	0,5	2-Aminoantraceno	1-5
<b>TA100</b>	Azida Sódica	5,0	2-Aminoantraceno	1-5
<b>TA102</b>	Mitomicina C	0,5	Benzo[a]Pireno	20-50

<b>Cepa</b>	<b>-S9</b>	<b>IM</b>	<b>+S9</b>	<b>IM</b>
<b>TA97</b>	4-Nitroquinolino-N-Óxido	7.88	2-Aminoantraceno	4.83
<b>TA98</b>	4-Nitroquinolino-N-Óxido	14.7	2-Aminoantraceno	6.77
<b>TA100</b>	Azida Sódica	25.0	2-Aminoantraceno	2.92
<b>TA102</b>	Mitomicina C	13.5	Benzo[a]Pireno	4.48

**Anexo IV:** Gráficos de parasitemia, mortalidade e curva ponderal da DB1967 em ensaio de eficácia aguda em modelo murino de infecção pelo *T. cruzi*



Parasitemia, percentual de morte acumulada no tratamento e curva ponderal no tratamento com a DB1967 no modelo experimental de infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* ( $10^4$  parasitos de cepa Y / camundongo). Os gráficos refletem os valores de média e desvio padrão de cada grupo avaliado.

## Anexo V



# Different Therapeutic Outcomes of Benznidazole and VNI Treatments in Different Genders in Mouse Experimental Models of *Trypanosoma cruzi* Infection

F. H. Guedes-da-Silva,<sup>a</sup> D. G. J. Batista,<sup>a</sup> C. F. da Silva,<sup>a</sup> M. B. Meuser,<sup>a</sup> M. R. Simões-Silva,<sup>a</sup> J. S. de Araújo,<sup>a</sup> C. G. Ferreira,<sup>a</sup> O. C. Moreira,<sup>b</sup> C. Britto,<sup>b</sup> G. I. Lepesheva,<sup>c</sup> Maria de Nazaré C. Soeiro<sup>a</sup>

Laboratório de Biologia Celular<sup>a</sup> and Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas,<sup>b</sup> Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; Department of Biochemistry, Institute for Global Health, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA<sup>c</sup>

The lack of translation between preclinical assays and clinical trials for novel therapies for Chagas disease (CD) indicates a need for more feasible and standardized protocols and experimental models. Here, we investigated the effects of treatment with benznidazole (Bz) and with the potent experimental *T. cruzi* CYP51 inhibitor VNI in mouse models of Chagas disease by using different animal genders and parasite strains and employing distinct types of therapeutic schemes. Our findings confirm that female mice are less vulnerable to the infection than males, show that male models are less susceptible to treatment with both Bz and VNI, and thus suggest that male models are much more suitable for selection of the most promising antichagasic agents. Additionally, we have found that preventive protocols (compound given at 1 dpi) result in higher treatment success rates, which also should be avoided during advanced steps of *in vivo* trials of novel anti-*T. cruzi* drug candidates. Another consideration is the relevance of immunosuppression methods in order to verify the therapeutic profile of novel compounds, besides the usefulness of molecular diagnostic tools (quantitative PCR) to ascertain compound efficacy in experimental animals. Our study aims to contribute to the development of more reliable methods and decision gates for *in vivo* assays of novel antiparasitic compounds in order to move them from preclinical to clinical trials for CD.

1 **Anexo VI**

2  
3 ***In vitro* and *In vivo* Trypanosomicidal Action of Novel Arylimidamides Against**

4 ***Trypanosoma cruzi***

5  
6  
7 Guedes-da-Silva, FH<sup>1</sup>; Batista DGJ<sup>1</sup>; Meuser, MB<sup>1</sup>; Fulco, TO<sup>1</sup>; **Araújo, JS<sup>1</sup>**; Da Silva, PB<sup>1</sup>; Da Silva  
8 CF<sup>1</sup>; Patrick, DA<sup>2</sup>; Bakunova, SM<sup>2</sup>; Bakunov, AS<sup>2</sup>; Tidwell, RR<sup>2</sup>; Oliveira, GM<sup>1</sup>; Britto, C<sup>3</sup>; Moreira,  
9 OC<sup>3</sup> and Soeiro, MNC<sup>1\*</sup>

10  
11  
12 <sup>1</sup>*Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de*  
13 *Janeiro, RJ, Brazil*

14 <sup>2</sup>*University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina, USA*

15 <sup>3</sup>*Laboratório de Biologia Molecular e Doenças Endêmicas Instituto Oswaldo Cruz, Fundação*  
16 *Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

17  
18  
19  
20  
21 Running title: Trypanocidal effect of arylimidamides

22  
23  
24  
25  
26  
27 \*Correspondent footnote

28 E-mail: soeiro@ioc.fiocruz.br

29 Phone Number: 55 21 25621368

30 Fax Number: 55 21 25984469



## Anexo VII

### Phenotypic Screening *In Vitro* of Novel Aromatic Amidines Against *Trypanosoma cruzi*

Simões-Silva, MR<sup>a</sup>; Nefertiti, ASG<sup>a</sup>; **De Araújo, JS<sup>a</sup>**; Batista, MM<sup>a</sup>; Da Silva, PB<sup>a</sup>; Bahia, MT<sup>b</sup>; Menna-Barreto, RS<sup>a</sup>; Pavão, BP<sup>a</sup>; Green, J<sup>c</sup>; Farahat, AA<sup>c,d</sup>; Kumar, A<sup>c</sup>; Boykin, DW<sup>c</sup> and Soeiro, MNC<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>b</sup>Laboratório de Doenças Parasitárias, Escola de Medicina & Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

<sup>c</sup>Department of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, Georgia, USA

<sup>d</sup>Department of Pharmaceutical Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt.

Running Title: *In vitro* trypanocidal effect of novel amidines

Keywords: Chagas disease, experimental chemotherapy, *Trypanosoma cruzi*, amidines

\* Corresponding author at Av. Brasil, 4365 Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

Phone: 55 21 2562-1368; fax: 055 21 2598-4577

Email address: soeiro@ioc.fiocruz.br (M.N.C. Soeiro)

## Anexo VIII

### Phenotypic evaluation of novel arylimidamides in acute mouse models of *Trypanosoma cruzi* infection

Cristiane França da Silva<sup>1</sup>, Denise da Gama Jaen Batista<sup>1</sup>, Julianna Siciliano de Araújo<sup>1</sup>, Marcos Meuser Batista<sup>1</sup>, Chad E. Stephens<sup>2</sup>, Moloy Banerjee<sup>3</sup>, Abdelbasset A. Farahat<sup>3,4</sup>, David W. Boykin<sup>3</sup> and Maria de Nazaré Correia Soeiro<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Biologia Celular, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*

<sup>2</sup>*Department of Chemistry and Physics, Augusta University, Augusta, Georgia, USA.*

<sup>3</sup>*Department of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, Georgia, USA.*

<sup>4</sup>*Department of Pharmaceutical Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mansoura University, Mansoura, Egypt*

#Corresponding author:

Laboratory of Cellular Biology

Maria de Nazaré Correia Soeiro

Av. Brasil, 4365. Manguinhos. Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Tel: +055 21 25621368

Fax: +055 21 25621432

Email: [soeiro@ioc.fiocruz.br](mailto:soeiro@ioc.fiocruz.br)

**Keywords:** Chagas disease, arylimidamides, experimental chemotherapy, *in vivo*.