

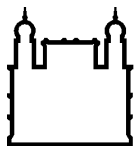
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS AROMÁTICOS
HETEROCÍCLICOS AMIDÍNICOS E QUINOLÍNICOS SOBRE *Trypanosoma cruzi*
E CÉLULAS HOSPEDEIRAS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

ALINE NEFERTITI SILVA DA GAMA

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

ALINE NEFERTITI SILVA DA GAMA

ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS AROMÁTICOS
HETEROCÍCLICOS AMIDÍNICOS E QUINOLÍNICOS SOBRE *Trypanosoma cruzi* E
CÉLULAS HOSPEDEIRAS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

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

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

RIO DE JANEIRO

Dezembro de 2015

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

G184 Gama, Aline Nefertiti Silva da

Atividade biológica de compostos sintéticos aromáticos heterocíclicos amidínicos e quinolínicos sobre *Trypanosoma cruzi* e células hospedeiras: estudos *in vitro* e *in vivo* / Aline Nefertiti Silva da Gama. – Rio de Janeiro, 2015.

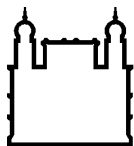
xv, 108 f. : il. ; 30 cm.

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

Bibliografia: f. 91-103

1. Doença de Chagas. 2. Amidinas aromáticas. 3. Quinolinas. 4. Quimioterapia experimental. 5. Análises *in silico* ADMET. 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: ALINE NEFERTITI SILVA DA GAMA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS AROMÁTICOS
HETEROCÍCLICOS AMIDÍNICOS E QUINOLÍNICOS SOBRE *Trypanosoma cruzi*
E CÉLULAS HOSPEDEIRAS: ESTUDOS IN VITRO E IN VIVO**

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

Aprovada em: 04/ 12/ 2015

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Mirian Claudia de Souza Pereira- **Presidente** (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr^a. Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro (IOC/Fiocruz)

Prof. Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho (INMETRO)

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


Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral (IOC/Fiocruz)



Ministério da Saúde


Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Celular e Molecular de **Aline Nefertiti Silva da Gama**, sob orientação da Dr.^a Maria de Nazaré Correia Soeiro. Ao quarto dia do mês de dezembro de dois mil e quinze, realizou-se às quatorze horas, no Auditório Maria Deane/FIOCRUZ, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **"ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS AROMÁTICOS HETEROCÍCLICOS AMIDÍNICOS E QUINOLÍNICOS SOBRE *Trypanosoma cruzi* E CÉLULAS HOSPEDEIRAS: ESTUDOS *in vitro* E *in vivo*."** no programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Biologia Celular e Molecular, na linha de pesquisa: Caracterização bioquímica, molecular, genética ou estrutural de agentes infecciosos e seus hospedeiros. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr.^a Mirian Cláudia de Souza Pereira - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr.^a Marlene Marcuzzo do Canto Cavalheiro - IOC/FIOCRUZ, Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho - Inmetro e como suplentes: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral - IOC/FIOCRUZ e Dr. Otacilio da Cruz Moreira - IOC/FIOCRUZ. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela aprovação da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, a Coordenadora do Programa, Dr.^a Leila de Mendonça Lima, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 04 de dezembro de 2015.


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


Dr.^a Marlene Marcuzzo do Canto Cavalheiro (Membro da Banca)


Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho (Membro da Banca)


Dr.^a Leila de Mendonça Lima (Coordenador do Programa)

Dedico este trabalho a meus familiares e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que é a fonte em que procuro forças para não esmorecer, principalmente durante os momentos difíceis, que me mostra a cada dia o quão breve é a nossa jornada aqui.

A minha “nova” família, meu enteado João Pedro, meus sogros Wanda e Adhemar por me acolherem em sua família e me tornarem realmente parte dela. Muito obrigada por tudo! Pela preocupação com minha saída e chegada, pelo carinho e por fazer aquela comidinha tão deliciosa, Dona Wanda!

A minha família, meus amados pais, Carmélia e Raimundo, meus irmãos Alexandre e André, minhas tias queridas, Maria, Sebastiana e Jacira e minha prima/irmã Michelle, por sempre acreditarem no meu potencial e me apoiarem. Devo muito a vocês, pois sem vocês eu não seria quem sou hoje! Obrigada por todo amor!

A Dra Denise da Gama, minha amiga, prima/irmã querida e que tenho o prazer de trabalhar todos os dias no Laboratório de Biologia Celular. Agradeço por todas as “caronas” até *Nikiti City*, por compartilhar tanto risadas quanto momentos de tensão, por todo conhecimento transferido e pelos feriados em que trabalhamos juntas!! Obrigada! A Dra. Cristiane França por toda ajuda, principalmente pelas horas e dias na experimentação animal, pelas caronas, pelas risadas e todo apoio oferecido. Muito obrigada, por tudo!

Ao fantástico grupo do Laboratório de Biologia Celular (LBC) as Dras Maria Alice Amaral, Kelly Demarque e a Dra Solange de Castro. Ao Dr Gabriel Oliveira por todos os ensinamentos e auxílio na experimentação animal. Agradeço também as pessoas maravilhosas que fazem parte do meu dia a dia no LBC, Hildemagna Guedes, Camila Cardoso, Raíza Brandão, Beatriz Pavão, Juliana da Silva, Rayane Nogueira, Marianne Rocha, Julianna Siciliano, Thabata Duque e aos demais colegas. Obrigada por todos os conhecimentos, risos e até choro, enfim, obrigada por tudo!

Gostaria de agradecer a técnica Patrícia Bernardino, por todos os experimentos e conhecimentos, pelo cafezinho das manhãs e pela gargalhada inconfundível! Não poderia esquecer o técnico Marcos Meuser, por todo conhecimento, horas e horas de experimentos! Vocês fizeram toda a diferença!

Em especial minha orientadora, Dra Maria Nazaré Soeiro por acreditar no meu potencial, pela paciência e vontade de me ensinar, pelo apoio acadêmico e pessoal. Sou muito grata!

Também gostaria de agradecer ao Dr. Boykin e seu grupo por disponibilizar os compostos estudados nesta dissertação; aos Drs Eduardo Caio e Edézio Ferreira pelo auxílio e colaboração com os dados *in silico*; ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, pela qualidade de ensino.

Gostaria de agradecer a Dra Mirian Pereira pela revisão deste trabalho e por aceitar o convite para compor a banca examinadora. A Dra Marilene Cavalheiro e aos Drs Celso Barbosa, Elmo Amaral, Otacílio Moreira por aceitarem o convite para compor a banca desta dissertação.

A Mariana Almeida, amiga para todas as horas! Obrigada por sempre acreditar que eu conseguiria, mesmo quando eu não acreditava. Por todos os conselhos, por todo o apoio, em vários âmbitos da minha vida. Muito obrigada!

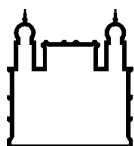
E por fim ao meu esposo Leonardo Avellar, por fazer parte da minha vida, por me apoiar e compreender os momentos que estive ausente, que precisei sair bem cedo e chegar bem tarde. Obrigada por me ouvir repetir milhões de vezes as mesmas apresentações de estudo, por todo amor, atenção, carinho e dedicação que você me oferece e trouxe para a minha vida. Amo você!

“Foi o tempo que dedicaste à tua rosa que a fez tão importante”

Antoine de Saint-Exupéry

“Tudo o que temos de decidir é o que fazer com o tempo que nos é dado”

J.R.R.Tolkien



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS SINTÉTICOS AROMÁTICOS
HETEROCÍCLICOS AMIDÍNICOS E QUINOLÍNICOS SOBRE *Trypanosoma cruzi* E
CÉLULAS HOSPEDEIRAS: ESTUDOS *IN VITRO* E *IN VIVO*
RESUMO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aline Nefertiti Silva da Gama

Trypanosoma cruzi é o agente etiológico da doença de Chagas (DC), uma parasitologia endêmica da América Latina e que afeta cerca de 8 milhões de pessoas. Desde a sua descoberta, há 106 anos pelo médico brasileiro Carlos Chagas, sua quimioterapia permanece insatisfatória, principalmente devido à sua baixa eficácia, especialmente durante a fase crônica tardia, os severos efeitos colaterais, a resistência natural de algumas cepas de *T. cruzi* para nitroderivados usados na clínica: benzonidazol (Bz) e Nifurtimox (NIF). Deste modo, estas limitações reforçam a necessidade de identificar novos agentes anti-*T. cruzi* a partir de compostos naturais e/ou sintéticos. Neste contexto, estudos apontam promissora ação biológica contra patógenos intracelulares de moléculas aromáticas heterocíclicas, como amidinas aromáticas (AA), em especial as arilimidamidas (AIAs), e compostos quinolínicos. Assim, no presente estudo o efeito tripanocida de oito AA (4 mono-AA e 4 bis-AA), uma bis-AIA e nove quinolinas foram testadas *in vitro* contra as diferentes formas (tripomastigotas sanguínea - BT e formas intracelulares) e cepas (DTU I e DTU VI) do *T. cruzi*, avaliando seu possível perfil tóxico em células hospedeiras de mamíferos. Análise *in silico* (programa pkCSM) revelou que amidinas (como DB2251 e DB2253) apresentam alta probabilidade de boa permeabilidade e absorção, não exibindo perfil de mutagenicidade, não sendo inibidores de hERG1, exibindo grande volume de distribuição, que são características desejáveis de um novo fármaco para DC. Nossos dados demonstraram que AA e quinolinas exibiram um potente efeito sobre BT, destacando-se as mono-AA (DB2228, DB2229, DB2292 e DB2294), as bis-AA (DB2232 e DB2235), a bis-AIA (DB2255) além de quatro quinolinas (DB2131, DB2186, DB2191 e DB2217), que resultaram em superiores taxas de morte do parasita na faixa de EC₅₀ de 5,8– 0,78 a μM em comparação com Bz (EC₅₀ =9,6 μM). Em relação à toxicidade, exceto a DB2235 e DB2251, nenhum composto testado foi tóxico para células de mamíferos até à maior concentração testada (96 μM) após 24 e 96 horas de incubação. Ao investigar a ação sobre formas intracelulares (cepa Tulahuen), apenas a bis-AIA (DB2255), demonstrou atividade similar ao Bz (EC₅₀=3,6 e 3 μM , respectivamente). Por outro lado, oito quinolinas foram mais eficazes do que Bz, exibindo valores de EC₅₀ entre 0,6 até 0,1 μM . Com base nos dados de índices de seletividade (IS) superiores ao Bz sobre as formas intracelulares (>600), três compostos quinolínicos (DB2186, DB2191 e DB2192) seguiram para teste *in vivo*. Não foram observados significativos eventos de toxicidade aguda quando estudos foram conduzidos até a dose de 200 mg/kg em modelos murino. Quando estudos de eficácia sobre modelos de infecção aguda experimental (camundongos machos infectados com 5×10^4 formas sanguíneas) foram realizados observamos que somente a DB2186 foi capaz de reduzir de modo importante (>60%) o pico parasitêmico dos animais infectados com a cepa Y e tratados por 5 dias com 50mg/kg/dia a partir da positividade da parasitemia (5dpi). Importante destacar que somente esta quinolina exibiu consideráveis ISs (123 e 640) e atividade *in vitro* (0,78 e 0,15 μM) sobre as formas sanguíneas e intracelulares das cepas Y e Tulahuen, respectivamente. Nossos resultados confirmam uma melhor predição entre achados *in vitro* e *in vivo* quando se considera a eficácia (<1 μM) e em especial a seletividade (>100) sobre as distintas formas do parasito relevantes para infecção humana e com ação sobre diferentes DTUs, como II e VI, como preconizado para perfil de candidatos a novos fármacos para DC.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

BIOLOGICAL ACTIVITY OF HETEROCYCLE AROMATIC AMIDINIC AND QUINOLINIC COMPOUNDS AGAINST *TRYPANOSOMA CRUZI* AND HOST CELLS: STUDIES *IN VITRO* AND *IN VIVO*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Aline Nefertiti Silva da Gama

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease (CD), an endemic illness in Latin American which affects around 8 million people. Since your discovery, 106 years ago by the Brazilian doctor Carlos Chagas, the chemotherapy of this pathology is unsatisfactory, mainly due to its poor efficacy especially during the later chronic phase, the considerable side effects, the natural resistance of *T. cruzi* strains to nitroderivatives used in clinical, benznidazole (Bz) and Nifurtimox (Nif). These facts emphasize the need to search for natural and/or synthetic new drugs. In this context, there are many synthetic compounds reported with biological activity, like aromatic amidines (AA), specially the arylimidamides (AIAs) and quinolinic compounds. Thus, in the present study the trypanocidal effect of the eight AA (4 mono-AA and 4 bis-AA), one bis-AIA and nine quinolines were tested *in vitro* against different forms (bloodstream trypomastigotes – BT and intracellular forms) and strains (DTU I and DTU VI) of *T. cruzi*, assessing their possible cytotoxic profile on mammalian host cells. Our findings demonstrated that the AA and quinolines exhibited a potent effect upon BT, highlighting the mono-AA (DB2228, DB2229, DB2292 and DB2294), the bis-AA (DB2232 and DB2235) and 4 quinolines (DB2131, DB2186, DB2191 and DB2217) that resulted in high death parasite rates in the range of EC₅₀ de 5.8– 0.78 a μM in comparison to Bz (EC₅₀ =9,6 μM). Regarding toxicity, except DB2235 and DB2251, none tested compound was toxic to mammalian cells up to the major tested concentration (96 μM) after 24 and 96 hours of incubation. To investigate the effect on intracellular forms (Tulahuen strain), only the bis-AIA (DB2255), demonstrate activity similar as to Bz (EC₅₀=3.6 e 3 μM , respectively). *In silico* analysis (pkCSM) revealed that the amidines DB2251 and DB2253 exhibit high probability of good permeability and absorption, high volume of distribution, not presenting mutagenic profile, besides not being hERG1 inhibitors, which are desirable characteristics of new drug for CD. On the other hand, eight quinolines were more effective than Bz, shown EC₅₀ values ranging from 0.6 to 0.1 μM . Based on the selectivity indices data (IS) higher than Bz upon intracellular forms (>600), three quinolinic compounds (DB2186, DB2191 and DB2192) followed to *in vivo* assays. No significant toxic events were noticed when acute toxicity studies were carried out up to a dose of 200 mg/kg in murine model. When efficacy studies on models of experimental acute infection (male mice infected with 5×10^4 blood forms) were performed we observed that only DB2186 was able to reduce of an important way (> 60%) the parasitemic peak of animals infected with the Y strain and treated with 50 mg/kg/ day for 5 days at the parasitemia onset (positivization of parasitemia at 5 dpi). Importantly, only this quinoline exhibited considerable ISs (123 and 640) and *in vitro* activity (0.78 and 0.15 μM) on blood and intracellular forms of the Y and Tulahuen strains. Our results confirm a better prediction of the findings *in vitro* and *in vivo* when considering efficacy (<1 μM) and in particular the selectivity (> 100) over distinct parasite forms to relevant human infection and acting on different DTUs, such as II and VI, as recommended to profiling candidates for new drugs to DC.

ÍNDICE

| | |
|---|------------|
| RESUMO | IX |
| ABSTRACT | X |
| 1. INTRODUÇÃO | 16 |
| 1.1 A Doença de Chagas – um breve histórico | 16 |
| 1.2 O Trypanosoma cruzi e seu ciclo evolutivo | 17 |
| 1.3 Transmissão e controle..... | 19 |
| 1.4 Sintomatologia | 20 |
| 1.5 Tratamento clínico | 20 |
| 1.6 Amidinas aromáticas..... | 22 |
| 1.7 Quinolinas..... | 26 |
| 2. OBJETIVOS | 29 |
| 2.1 Objetivo Geral..... | 29 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 29 |
| 3. ARTIGO PUBLICADO | 30 |
| 4. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO | 52 |
| 5. DISCUSSÃO | 75 |
| 6. CONCLUSÕES | 83 |
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 84 |
| APÊNDICE A – INFORMAÇÕES TÉCNICAS ADICIONAIS | 99 |
| APÊNDICE B – COLABORAÇÃO EM TRABALHOS | 100 |

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Esquema ilustrativo das etapas do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* (extraído de Atlas Didático - O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*, 2011)
- Figura 2 Estruturas químicas do nifurtimox (A) e do benzonidazol (B), fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas
- Figura 3 Estruturas químicas da pentamidina (A), diamidina DB569 (B) e da arilimidamida DB613 (C).
- Figura 4 Estruturas químicas de mono-amidina (DB2228) e bis-AIA (DB766).
- Figura 5 Estrutura química: A: Quinina e B: Cloroquina.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Perfil do produto alvo do DNDi (adaptado de DNDi, 2015)
- Tabela 2 Critérios de novos candidatos (Hit compound) para Doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset, 2013).
- Tabela 3 Critérios de novos candidatos (Lead compound) para Doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset, 2013).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| ADMET | Absorção, Distribuição, Metabolismo, Excreção e Toxicidade |
| ALT | Alanine Transaminase |
| AT | Adenosina e Timina |
| AST | Aspartato Transaminase |
| BT | Bloodstream |
| BUN | Blood Urea Nitrogen |
| Bz | Benzonidazol |
| CC | Células cardíacas |
| CK | Creatinine Kinase |
| CYP51 | C-14 α -demetilase |
| DC | Doença de Chagas |
| DMPK | Drug, Metabolism and Pharmacokinetic |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| DNDi | Drugs for Neglected Diseases Initiative |
| DTU | Discrete Typing Unit |
| EC ₅₀ | Concentração mínima de 50% de eficácia |
| H | Hora |
| I.P | Intraperitoneal |
| IS | Índice de seletividade |
| kDNA | DNA do cinetoplasto |
| LAFEPE | Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco |
| LC ₅₀ | Limiar de toxicidade |
| Nf | Nifurtimox |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| pH | Potencial de Hidrogênio |
| pKa | Constante de ionização de ácidos |
| pkCSM | Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic |
| P.O | Per oral |
| Pos | Posaconazol |
| Pt | Pentamidina |

| | |
|-----|---------------------------|
| RNA | Ácido ribonucleico |
| Rav | Ravuconazol |
| TPP | Target Product Profile |
| VP | Vacuolo parasitoforo |
| WHO | World Health Organization |

1. INTRODUÇÃO

1.1 A Doença de Chagas – um breve histórico

A Doença de Chagas (DC) foi descoberta pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, que observou pela primeira vez em um inseto hematófago, conhecido vulgarmente por “barbeiro” (por realizar a hematofagia principalmente na face), numerosos flagelados na porção posterior destes insetos. O processo de descoberta desta patologia deu-se no início de 1907, quando Carlos Chagas chegou ao norte de Minas Gerais, em uma cidade chamada Lassance, com a missão de estudar e adotar medidas de controle dos frequentes surtos de malária nesta região e que inviabilizavam a construção da Estrada de Ferro Central do Brasil. Porém, sua atenção foi desviada pelo “barbeiro” e seu hábito alimentar, hematofagismo. Estes insetos infestavam a casa de moradores que apresentavam quadros clínicos não associados a malária, levando-o a pesquisar o sangue destes pacientes. Através de diversos estudos Chagas constatou a presença do parasito no triatomíneo correlacionando seu potencial papel na transmissão deste protozoário, que foi nomeado por ele de *Schizotrypanum cruzi*. Em paralelo as observações acerca das alterações patológicas inexplicáveis nos habitantes da região, Chagas se interessou por investigar as ligações entre o novo parasito e a condição mórbida daquela população.

Neste contexto, ele demonstrou através de estudos *in vivo* conduzidos em animais de laboratório (além da observação em animais domésticos) que este agente era capaz de causar infecção. Em 1909, após inúmeros exames realizados em pacientes de causa indeterminada, Chagas teve sua hipótese confirmada ao encontrar no sangue periférico de Berenice, uma menina de três anos de idade, o patógeno previamente identificado em insetos e animais. Assim, em 22 de abril 1909 ele revelou ao mundo não somente uma nova zoonose, a doença de Chagas, mas também seu agente etiológico, agora denominado *Trypanosoma cruzi* (em homenagem a seu mestre Oswaldo Cruz), o ciclo evolutivo deste parasito tanto no hospedeiro vertebrado (mamíferos como homem) como também no inseto invertebrado, seu vetor (Ordem Hemiptera, Família Reduviidae e Sub-família Triatominae) além de seus hábitos. O conjunto

destes achados fez de sua descoberta um feito inédito no campo da medicina e da ciência (Malfaias & Rodrigues, 2010; Kropf, 2006, Chagas, 1909).

1.2 O *Trypanosoma cruzi* e seu ciclo evolutivo

O *T. cruzi* apresenta formas parasitárias distintas: (i) proliferativas: epimastigota e amastigota. A primeira encontrada no hospedeiro invertebrado (triatomíneos), multiplicando-se no interior do trato digestório e a segunda, no citoplasma de células do hospedeiro vertebrado, além de uma (ii) não proliferativa e altamente infectiva, a tripomastigota, que circula no sangue periférico (tripomastigotas sanguíneas), sendo também encontrada no intestino posterior do inseto vetor com a denominação de tripomastigota metacíclica (Teixeira et al., 2011; De Souza, 2007).

O ciclo pode se iniciar com a contaminação do inseto (**Figura 1**), que se dá ao realizar hematofagia no homem, ou em outro animal parasitado (1) contraindo as formas tripomastigotas presentes no sangue periférico. Uma vez no vetor (2) estas no interior do trato digestório, sofrem diferenciação para formas epimastigotas (3) que se multiplicam ativamente através de ciclos de divisões binárias (4). Na porção terminal do intestino, estas formas se diferenciam por metaciclogênese em tripomastigotas metacíclicas, (5), que são formas infectantes liberadas nas fezes e urina após um novo repasto sanguíneo (6). Ao terem seu trato digestório preenchido pelo sangue do hospedeiro vertebrado, este pressiona o intestino do triatomíneo que por sua vez urina e defeca liberando assim os parasitos (Bern, 2015; Rassi et al., 2012).

No vertebrado, através da lesão causada pela picada na pele ou por mucosas íntegras, as formas metacíclicas (7) infectam células no sítio de entrada do parasito (incluindo macrófagos) (8). Após um breve período no interior de um vacúolo parasitóforo (VP), os parasitos medeiam lise da membrana do VP (ação enzimática de transialidases e de porinas “like”) (9) e no citoplasma de suas células hospedeiras completam a diferenciação para formas amastigotas (10), que se multiplicam também por divisão binária (11). Após vários ciclos de divisão (de 2 a 9 ciclos), os parasitos sofrem novamente diferenciação para tripomastigotas (12), que são liberados pela ruptura da célula parasitada (13) (Rassi et al., 2012; Teixeira et al., 2011). Estes parasitos podem atingir a corrente sanguínea e linfática (14) alcançam outros órgãos e tecidos disseminando a

infecção e/ou serem ingeridos pelo inseto vetor, dando continuidade ao ciclo, além de infectar células próximas ao sítio de infecção (15 a, b) (Bern, 2015; Teixeira et al., 2011).

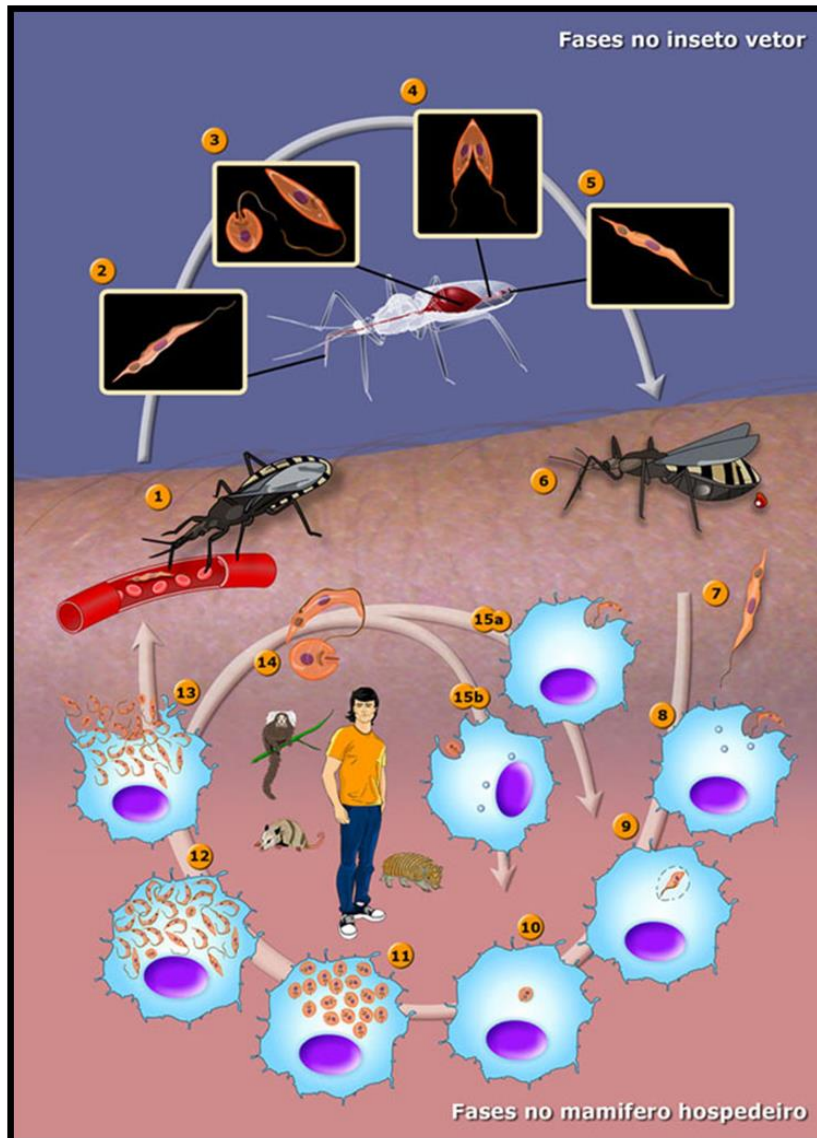


Figura 1: Modificado do Atlas Didático – Ciclo de Vida do *Trypanosoma cruzi*, Teixeira et al., 2011. Inicialmente o triatomíneo se alimenta de sangue de um hospedeiro vertebrado (mamífero) (1) contendo as formas tripomastigotas sanguíneas (2). Os parasitos se diferenciam em epimastigotas (3), e no intestino do inseto replicam por fissão binária (4). Após ciclos de multiplicação, os parasitos se convertem na forma infectiva tripomastigota metacíclica (5), que é liberada nas fezes e urina do triatomíneo na região da picada (6 e 7). Estes tripomastigotas infectam as células do sítio da picada do barbeiro (8), e após um curto periodo no interior de um vacúolo parasitóforo (9) rompem a membrana do vacúolo e finalizam sua diferenciação para amastigotas no citoplasma das células hospedeiras (10). Amastigotas replicam no citoplasma da célula (11) e subsequentemente se diferenciam em tripomastigotas (12) que representam a principal formam liberada frente a ruptura da membrana plasmática da célula hospedeira (13). Por sua vez, estas formas chegam a corrente sanguínea podendo alcançar outros órgãos e/ou serem ingeridos pelo inseto vetor (14) além de infectar as células próximas ao sítio de infecção.

1.3 Transmissão e controle

A doença de Chagas (DC) é endêmica em 21 países da América Latina, pertencendo ao grupo das 17 doenças negligenciadas, como a leishmaniose, doença do sono, entre outras. A DC afeta cerca de 8 milhões de pessoas em todo o mundo e 50 milhões encontram-se sob o risco de contrai-la (WHO, 2015).

Este grupo de doenças negligenciadas, da qual a DC faz parte, acomete principalmente populações economicamente desfavorecidas e que habitam regiões tropicais e subtropicais, majoritariamente em áreas mais carentes de recursos. Estas localidades apresentam precariedade ou ausência de saneamento básico e infraestrutura geral, carecendo ainda de medidas constantes de vigilância epidemiológica, manutenção de políticas de controle, além de adoção de medidas de profilaxia, ações educativas e de modo importante, acesso a diagnóstico e tratamento (Viñas-Albajar & Dias, 2014).

As vias de transmissão do *T. cruzi* incluem a via vetorial (triatomíneo), transfusão de sangue, transplante de órgãos, materno-fetal, contaminação por via oral e acidentes de laboratório (Coura & Junqueira, 2015, Coura & Junqueira, 2015; Bern, 2011; Guhl, 2007). Embora o número de novos casos relacionados a infecção por essas vias tenha sido reduzido nos últimos anos devido as estratégias de controle adotadas por países endêmicos como Brasil, Chile e Argentina, vários desafios ainda são presentes, incluindo a disseminação em regiões não endêmicas. A globalização da DC devido a migração de portadores infectados para áreas urbanas, bem como para países não endêmicos, tem modificado o padrão epidemiológico desta zoonose (Viñas-Albajar & Dias, 2014; Bern & Montgomery, 2009; Coura, 2009).

Assim, esta silenciosa patologia ainda representa um sério problema de saúde pública em áreas endêmicas das Américas Central e do Sul, resultando em graves perdas econômicas. Cerca de US\$ 1,3 bilhões em perdas na força de trabalho das pessoas afetadas, também sendo responsável por um elevado número de aposentadorias precoces além dos elevados custos médicos, sendo uma das principais causas de morte por complicações cardíacas decorrentes de processos infecciosos (DNDi, 2015; De Souza et al., 2007).

1.4 Sintomatologia

A patogenia é essencialmente crônica em humanos ocorre em diferentes fases, com patologia e sintomas característicos: (i) fase aguda, na qual a maioria dos pacientes é assintomática, podendo-se observar ou não sinais clínicos inflamatórios localizados como chagoma de inoculação (na pele) e sinal de Romaña, sendo este último associado a infecção da conjuntiva pelo parasito (Romaña, 1935). Entre o pequeno percentual dos casos agudos clinicamente identificáveis, os sintomas podem incluir: febre, mal-estar, cefaléia, astenia, hipoxia, edema subcutâneo, aumento de volume dos gânglios linfáticos, hepato-espleno e cardiomegalia, alterações do sistema nervoso central (meningoencefalomielite), além de intensa reação inflamatória no tecido muscular liso e estriado (WHO, 2015; Bern et al., 2011). A parasitemia normalmente é patente, e com o desenvolvimento da resposta imune do hospedeiro, ao fim de 1 a 2 meses, em geral, há o controle do parasitismo tissular e circulante. Porém, a maior parte dos casos passa despercebida, pois muitos dos sintomas acima podem ser confundidos até mesmo com os de uma gripe. Percorrido esse tempo, inicia-se um período de equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro, denominado de (ii) fase crônica indeterminada. Esta fase consiste na presença da infecção, revelada por sorologia ou métodos parasitológicos indiretos associados à ausência de sintomatologia e exames clínicos, como eletrocardiogramas e raio-x, normais. A maioria dos indivíduos infectados (cerca de 70%) permanece nesta fase. Decorrendo 10 a 30 anos, podem aparecer, em cerca de 30-40% dos pacientes, as diferentes formas clínicas da fase crônica, cujas principais expressões clínicas incluem: (a) as alterações cardíacas (20-30%), a mais importante forma de limitação ao portador da doença e principal causa de morte; (b) as alterações digestivas (10%), (c) ambas as alterações (forma mista), quando o paciente associa a forma cardíaca com a digestiva, e (d) alterações neurológicas (2-8%) (Bern, 2015; WHO, 2015; Rassi et al., 2012; Teixeira et al., 2006).

1.5 Tratamento clínico

Após 106 anos de sua descoberta, esta zoonose é ainda considerada um grave problema de saúde pública, e seu tratamento baseia-se em dois fármacos nitro-heterocíclicos, o nitrofurano nifurtimox (Nif) (**Figura 2 A**), introduzido na clínica em 1965 e que teve sua produção descontinuada no Brasil; e o 2-nitroimidazol

benznidazol (Bz) (**Figura 2 B**) introduzido na década seguinte. Ambos permanecem até hoje como as únicas opções de tratamento, mas necessitam de longos períodos de administração e apresentam reações adversas associadas a perturbações no trato digestório, tais como inapetência, náusea, vômito e perda de peso com Nif, e dermatopatia e polineuropatia com Bz, que em muitos casos levam à interrupção do tratamento (Keenan & Chaplin, 2015; Patterson & Wyllie, 2014; Jackson et al., 2010; Coura & De Castro, 2002). Também apresentam falha terapêutica sobre a fase crônica tardia da doença (cura em torno de 20%), sendo mais ativos durante a fase aguda, 60-80% de cura, mas com limitada eficácia também nesta fase precoce sobre algumas cepas do parasito naturalmente resistentes (Wilkinson et al., 2008).

Neste contexto, diversos outros compostos têm sido clinicamente testados, como alopurinol, azoles entre eles cetaconazole, itraconazoles e mais recentemente o posaconazole e ravuconazole. Estes dois últimos apresentaram excelente atividade em modelos tanto *in vitro* e *in vivo*, sugerindo que poderiam ser promissores candidatos para o tratamento clínico da DC, porém exibiram falha terapêutica no tratamento de pacientes crônicos (Molina et al., 2015; Keenan & Chaplin, 2015). Deste modo justifica-se o estudo de novos agentes tripanocidas (naturais ou sintéticos), visando identificação de alternativas terapêuticas para esta grave patologia negligenciada. Instituições envolvidas no desenvolvimento de novos fármacos para patologias negligenciadas como Organização Mundial de Saúde (OMS) e a Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (*Drugs for Neglected Diseases initiative - DNDi*) sugerem critérios e características ideais e desejáveis de novos fármacos candidatos ao tratamento das doenças negligenciadas. Para a quimioterapia da DC estes candidatos a novos fármacos apresentam como principais características: (i) ação sobre as duas fases da doença, em especial sobre a fase crônica tardia, (ii) atividade sobre diferentes isolados do parasito (DTUs I, II, V e VI) e formas do parasito relevantes para infecção humana (formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas), (iii) baixa toxicidade e ausência de genotoxicidade, mutagenicidade e cardiotoxicidade, (iv) além da administração oral, (v) estabilidade (3-5 anos em zona climática) e (vi) baixo custo (Chatelain & Konar, 2015; DNDi, 2015). A **tabela 1** sumariza parâmetros ideais e aceitáveis, sugeridos para o tratamento da DC, segundo o DNDi.

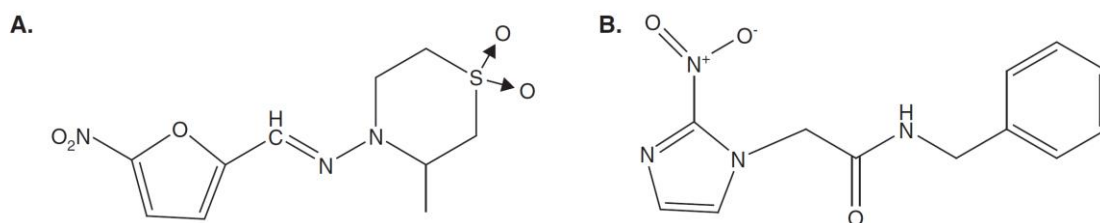


Figura 2: Estruturas químicas do nifurtimox (A) e do benznidazol (B), os dois fármacos nitro-derivados disponíveis atualmente para a quimioterapia da doença de Chagas.

Tabela 1: Perfil do produto alvo do DNDi (modificada de DNDi, 2015).

| | Aceitável | Ideal |
|--------------------------------|--|--|
| População alvo | Crônica | Crônica e aguda (reativações) |
| Distribuição geográfica | Todas as regiões | Todas as regiões |
| Eficácia | Dose padrão não inferior a benznidazole em todas as regiões | Superioridade à dose padrão de benznidazole para diferentes fases da doença (aguda e crônica) |
| Segurança | > Bz na frequência de descontinuações definitivas do tratamento para indicação médica (clínica e laboratorial) | > Bz na frequência de descontinuações definitivas do tratamento para indicação médica (clínica e laboratorial) |
| Contraindicações | Gravidez | Sem contraindicações |
| Precauções | Nenhuma genotoxicidade e sem potencial pró-arrítmico | Não há genotoxicidade, teratogenicidade e sem potencial pró-arrítmico |
| Interações | Nenhuma interação clinicamente significativa com fármacos antiarrítmicos e anticoagulantes | Nenhuma interação clinicamente significativa |
| Apresentação | Oral / Parenteral (POC curto) Adaptado à idade | Oral Adaptado à idade |
| Estabilidade | 3 anos, zona climática IV | 5 anos, zona climática IV |
| Regime de dosagem | Oral - qualquer duração Parenteral - <7 dias | <30 dias |
| Custo | Menor possível | Tratamentos atuais |

1.6 Amidinas aromáticas

As amidinas aromáticas são moléculas catiônicas heterocíclicas (**Figura 3**) e muitas delas, como a pentamidina que inicialmente foi sintetizada em 1937 (King et al., 1937), como análogo da insulina, e a furamidina (DB75 - derivada da pentamidina), apresentam atividade relacionada a sua associação à fenda menor do DNA de patógenos, nas regiões ricas em bases nitrogenadas adenina e timina, por meio de interações não covalentes e não intercalantes, inibindo a replicação e

transcrição, e mesmo sendo capazes de induzir alterações na organização e topologia do ácido nucléico (Daliry et al., 2011, Wilson et al., 2008). Importante considerar que a ligação ao DNA pode ser apenas uma etapa inicial do mecanismo de ação, seguida de alterações topológicas que poderiam levar a instabilidade e destruição do DNA, bem como a alterações na interação DNA-proteína, e conseqüente inibição da transcrição e/ou da replicação (Soeiro et al., 2009). De fato, não há uma correlação direta entre o grau de interação ao DNA e a atividade tripanocida em diamidinas (Mathis et al., 2007; Daliry et al., 2009). A natureza catiônica da pentamidina permite seu acúmulo na mitocôndria, podendo levar ao colapso do potencial da membrana mitocondrial, resultando na sua permeabilização e ativação da morte celular por apoptose (Werbovetz, 2006; De Souza et al., 2006; Soeiro et al., 2005). Frente ao grande número destas regiões ricas em bases AT no cinetoplasto (zona densa caracterizada por uma maior concentração de DNA, dando origem a uma estrutura intramitocondrial) do *T. cruzi*, assim como de outros membros da ordem Kinetoplastida, e mesmo no núcleo do *Plasmodium*, estes compostos têm sido intensamente estudados em ensaios pré-clínicos de ação antiparasitária (Soeiro et al., 2013). Em estudos com *L. mexicana* observou-se que em cepas resistentes à pentamidina, apesar da droga atravessar a membrana plasmática, ela não se acumula eficientemente na mitocôndria e não favorece a sua associação ao kDNA (Basselin, 2002).

Assim, apesar do esforço de muitos grupos de pesquisa, não foi possível estabelecer um único mecanismo para a atividade antiparasitária das amidinas aromáticas, tendo sido sugeridos diferentes alvos, além do DNA nuclear e mitocondrial, incluindo microtúbulos, acidocalcisomas, inibição de proteases, polimerases, proteína quinase e da síntese de fosfolipídios, além de distúrbios no metabolismo de poliaminas (Soeiro et al., 2013; Werbovetz, 2006; Mathis et al., 2006; Soeiro et al., 2005).

A pentamidina é ainda utilizada para o tratamento de doenças como a leishmaniose cutânea, infecções causadas por *Pneumocystis jiroveci* (comumente em paciente HIV positivo) e doença do sono (Soeiro, et al., 2013; Zhu et al., 2012; Wang et al., 2010). Em recente estudo realizado por Diáz e colaboradores (2014) foi demonstrada a atividade *in vitro* e *in vivo* da pentamidina sobre o *T. cruzi*. Neste estudo ela reduziu parcialmente níveis de parasitemia, resultando em maiores taxas de sobrevivência dos camundongos tratados. Porém, a pentamidina possui limitações quanto a sua utilização clínica por apresentar

considerável toxicidade, e uso parenteral. Este fármaco apesar de comprovada atividade antiparasitária, apresenta biodisponibilidade oral limitada, devido ao valor elevado de pKa atribuído ao grupamento funcional amidínico, além de poder induzir efeitos colaterais, como cardiotoxicidade, hepatotoxicidade e diabetes. Neste sentido, muitos análogos e derivados foram sintetizados e testados *in vitro* e *in vivo* com objetivo de aprimorar sua seletividade e propriedades farmacológicas (Wang et al., 2010; Wilson et al., 2008; Werbovetz, 2006).

Na última década, a pafuramidina (DB289), um pró-fármaco da DB75 administrada por via oral, demonstrou eficácia contra tripanossomíase africana em ensaio clínico de fase III. Todavia, o ensaio clínico estendido de segurança (fase I) evidenciou nefrotoxicidade tardia levando à interrupção de todo estudo (Paine et al., 2010). Outros análogos e derivados testados exibem também amplo espectro de atividade contra patógenos intracelulares causadores de patologias veterinárias e humanas, como leishmaniose, toxoplasmose e a própria doença de Chagas (De Araújo et al., 2014; Soeiro et al., 2013; Soeiro et al., 2008). Nosso grupo tem estudado esta classe de compostos e dados revelam a promissora ação de várias moléculas, obtendo de algumas excelentes resultados em estudos *in vitro* e *in vivo*, em especial com as arilimidamidas (AIAs), ou amidinas reversas (De Araújo et al., 2014; Da Silva et al., 2012; Batista et al., 2010; Pacheco et al., 2009). AIAs têm demonstrado um promissor perfil antiparasitário e potente ação contra diferentes parasitos intracelulares como por exemplo *Leishmania sp.* (Zhu et al., 2012; Wang et al., 2010; Stephens et al., 2003), *Neosporacanium* (Schorer et al., 2012; Debache et al., 2011), *Besnoitia besnoiti* (Cortes et al., 2011), *Echinococcus multilocularis* (Stadelmann et al., 2011) e *T. cruzi* (Soeiro et al., 2013). AIAs, diferem das diamidinas, por apresentarem a amidina ligada ao núcleo aromático da molécula, através de um átomo de nitrogênio, ao invés de estar mediado por um átomo de carbono (**Fig. 3**).

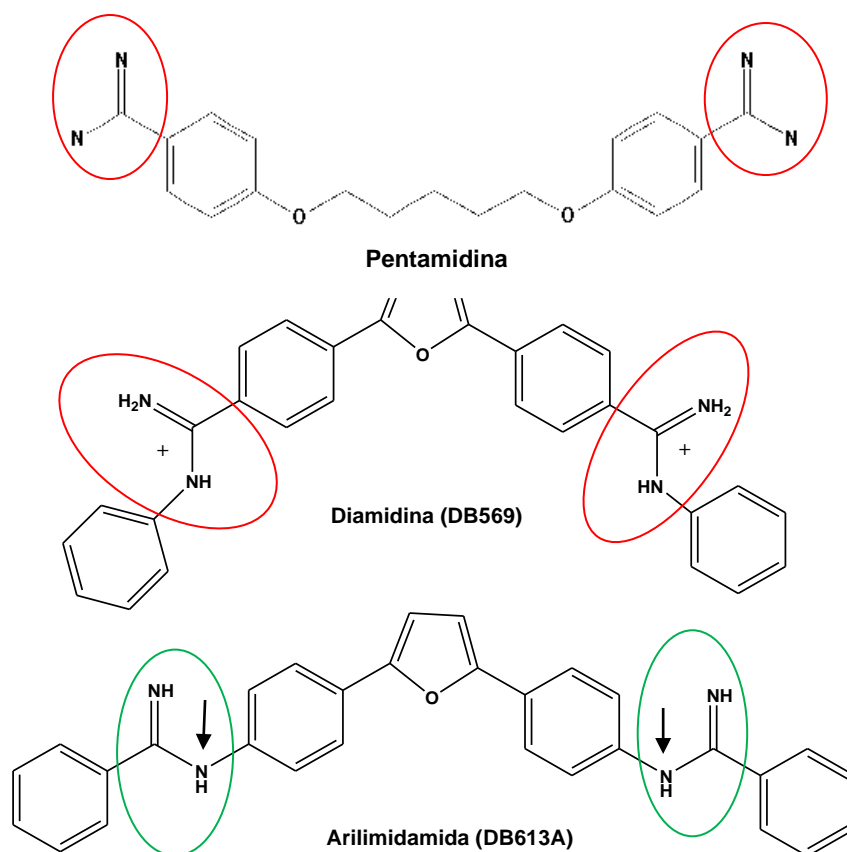


Figura 3: Estruturas químicas da pentamidina (A), diamidina DB569 (B) e da arilimidamida DB613 (C). Destacado em vermelho o grupo imino das diamidinas (pentamidina e DB569) diretamente ligado ao anel aromático da molécula. Destacado em verde o grupamento imino da AIA (DB613A) associado ao esqueleto aromático por um átomo de nitrogênio (seta).

Com valores menores de pKa (~7) e maior lipofilicidade em comparação com amidinas clássicas como a pentamidina, DB75 e seu análogo a DB569 (**Figura 3**), as AIAs apresentam atividade superior (>200x) contra formas intracelulares de *Leishmania* possivelmente devido ao aumento de sua permeabilidade (Wang et al., 2010; Rosypal et al., 2008). Experimentos realizados com AIAs como a DB1831 revelaram a excelente eficácia contra o *T. cruzi in vitro*, agindo na faixa nanomolar sobre as formas tripomastigotas sanguíneas a 37°C (EC₅₀= 20 nM) após 24 horas de incubação, e alcançando sobre os amastigotas intracelulares valores de EC₅₀ = 5 nM (Da Silva et al., 2012). Devido a baixa solubilidade da DB1831, outra síntese (mesmo princípio ativo) foi realizada utilizando o sal de mesilato visando promover a solubilidade desta AIA. Assim, ensaios *in vivo* com a correspondente, DB1965, revelaram excelente atividade tripanocida em modelos de infecção aguda experimental, com níveis semelhantes aos encontrados no Bz (Da Silva et al., 2012).

Em outros ensaios realizados com a AIA DB766, observou-se sua capacidade em suprimir a carga parasitária sanguínea e cardíaca, com níveis semelhantes aos encontrados em estudos realizados com o Bz, além de apresentar ação contra cepas naturalmente resistentes (Batista et al., 2010). Neste contexto, estudos têm sido conduzidos visando relacionar a estrutura dessas moléculas com sua atividade. Dados do nosso grupo mostram que as diamidinas lineares e menores que a DB75 são menos efetivas sobre o *T. cruzi* em relação a moléculas curvas, que exibem maior atividade e seletividade sobre as formas proliferativas e não proliferativas (Batista et al., 2010, Pacheco et al., 2009). Quanto a estrutura de moléculas amidínicas existem outras diferenças, tais como entre o número de grupos catiônicos terminais: mono-amidinas ou mono-AIAs, que apresentam somente um grupamento catiônico terminal (**Figura 4**) são em geral menos efetivas que as correspondentes diamidinas ou bis-AIAs, que apresentam dois grupamentos catiônicos nas extremidades da molécula (**Figura 3**) (De Araújo et al., 2014; Timm et al., 2014). As bis-AIAs como a DB 745, DB766 e DB1831 são muito ativas sobre tripanosomatídeos como *Leishmania* e *T. cruzi* (Da Silva et al., 2011; Wang et al., 2010; Batista et al., 2010). Devido a potente atividade e seletividade, sobre diferentes patógenos e sobre diferentes modelos (*in vitro* e *in vivo*) (De Araújo et al, 2014; Timm et al., 2014; Soeiro et al., 2013), justifica-se o desenvolvimento de novas pesquisas e o estabelecimento da relação atividade-estrutura dessa classe de composto, e que faz parte dos objetivos da presente dissertação.

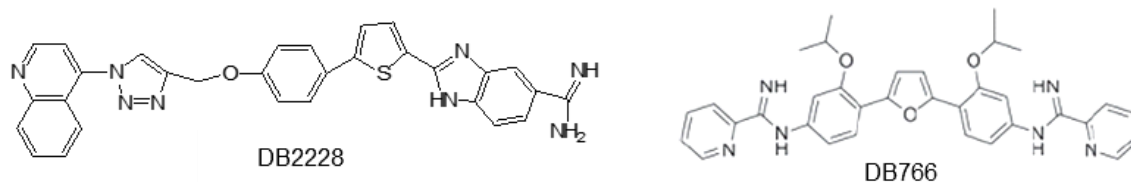


Figura 4: Estruturas químicas de uma mono-amidina (DB2228) e bis-AIA (DB766).

1.7 Quinolinas

A utilização medicinal da classe quinolílica data desde o final do século XVI e início do XVII. Dados históricos revelam seu uso através de infusões da casca da “quina-quina” (obtida da árvore *Cinchona officinales*) pelos índios do

Império Inca e de outras populações nativas das Américas, visando tratamento de febres.

A origem do nome dessa espécie se deu em 1638 em virtude da sua administração sob a forma de infusão á condessa Ana Del Chinchon, esposa do vice-rei espanhol no Peru, que estava acometida por uma febre terçã. Ao ingerir a poção de “quina-quina” feita e oferecida a ela pelo Xamã local, seu quadro clínico teve uma imediata melhora. Assim, mais tarde a árvore recebeu o nome de Cinchona em homenagem a condessa (França et al., 2008).

Com o retorno para o continente europeu dos jesuítas que atuavam em missão religiosa nas Américas, o uso da quinina presente na casca da “quina-quina”, foi amplamente difundido, pois eles levaram consigo cascas deste vegetal, para tratar diversas enfermidades que apresentavam febre. Visando suprir a demanda frente sua ampla utilização, a Cinchona foi plantada em território europeu, mas somente no início do século XIX os químicos franceses Pierre Joseph Pelletier e Joseph Bienaime Caventou identificaram o alcalóide quinina (**Figura 5**) como princípio ativo da casca da Cinchona. A quinina faz parte da família das quinolinas que inclui as 4-aminoquinolinas, as 8-aminoquinolinas e os álcoois quinolínicos. Ela foi amplamente utilizada para o tratamento da malária, porém como algumas cepas de *Plasmodium falciparum* tornaram-se resistentes, seu uso foi descontinuado, dando lugar a outros fármacos como a artemisinina (França et al., 2008). Outros compostos quinolínicos foram produzidos na clínica tendo como base a quinina, incluindo a cloroquinina (**Figura 5**), mefloquina (álcoois quinolínicos), amodiaquina, hidróxi-cloroquina (4-aminoquinolinas), primaquina e a pamaquina (8-aminoquinolinas), todos exibindo perfil de toxicidade e sendo posteriormente não efetivos sobre algumas cepas de *Plasmodium* que se tornaram também resistentes a estes fármacos, devido ao uso profilático indiscriminado em algumas regiões endêmicas (Gregson & Plowe, 2005).

O mecanismo de ação dos compostos quinolínicos ainda não é bem elucidado. Em plasmódio sugere-se que eles possam atuar no vacúolo digestivo promovendo alteração no gradiente de pH, inibindo assim a cristalização da hemoziona, ou ainda através da sua associação covalente ao DNA dos parasitos impedindo sua replicação e através da geração de metabólitos altamente reativos, que por sua vez podem gerar espécies reativas de oxigênio afetando a cadeia de transporte de elétrons da mitocôndria, entre outros mecanismos propostos

(Basso et al., 2011; Ferreira, Gomes, Vieira, 2011; O'Neill et al., 2010; Vale & Moreira, 2009; O'Neill et al., 2006)

Atualmente, novas estratégias antimaláricas são oferecidas, entre elas a terapia combinada com outros fármacos incluindo a artemisinina (Biamonte et al., 2013). Devido a sua potente atividade antimalárica, outros estudos pré-clínicos para diversas patologias foram desenvolvidos utilizando compostos sintéticos (análogos, derivados e híbridos) (Vandekerckhove et al., 2013) além de moléculas de origem natural contendo o cerne quinolínico (Chung et al., 2015). Dados demonstram alta atividade de quinolinas e de seus derivados alcaloides com ação anticâncer (Lam et al., 2014), anti-inflamatória (Bano et al., 2013; Ratheesh, Sindhu, Helen, 2013) entre outras. É importante ressaltar os estudos conduzidos sobre distintos micro-organismos patogênicos exibindo ação antibacteriana (Lam et al., 2014; Basak et al., 2015), antifúngica (Vandekerckhove & D'hooghe, 2015), leishmanicida (Hernández-Chinea et al., 2015; Gopinath et al., 2014; Reynolds et al., 2013), e tripanocida como sobre *Trypanosoma bruce* e *Trypanosoma cruzi* (Hiltensperger et al., 2015; Mbwambo et al, 2006).

Deste modo, síntese e pequenas modificações em compostos quinolínicos, de origem natural ou sintética, e suas análises pré-clínicas se faz igualmente justificada, visando identificar alternativas para o tratamento de diversas doenças, incluindo a doença de Chagas. Devido a grande ação de quinolinas sobre diferentes patógenos e, em especial os poucos estudos sobre a atividade desta classe de compostos contra o *T. cruzi* nos propusemos a avaliar neste estudo o potencial tripanocida de derivados quinolínicos.

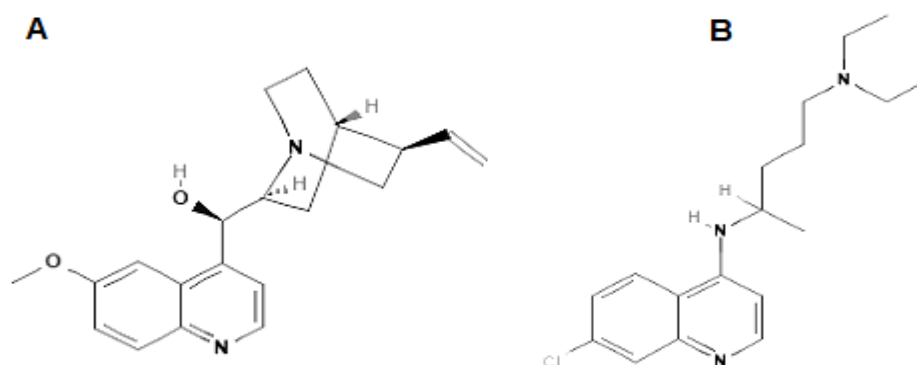


Figura 5: Estrutura química da quinina (A) e cloroquina (B).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar a eficácia e seletividade de novos compostos sintéticos heterocíclicos amidínicos e quinolínicos através de ensaios pré-clínicos (estudos *in vitro* e *in vivo*), de modo a identificar novos candidatos tripanocidas com ação sobre o *Trypanosoma cruzi*, comparando com ação do fármaco de referência, o benzonidazol (Bz).

2.2 Objetivos Específicos

Para determinar a atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo* das séries de amidinas aromáticas e quinolinas os seguintes objetivos específicos foram projetados:

- a) Avaliar *in vitro* a ação dos compostos heterocíclicos sobre as formas relevantes para infecção humana: formas tripomastigotas sanguíneas e amastigotas, investigando as diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* representantes dos DTUs II e VI;
- b) Caracterizar *in vitro* o perfil de toxicidade dos compostos (cinética de exposição) sobre culturas de células de mamíferos;
- c) Explorar por ensaios *in silico* o perfil de ADMET dos compostos amidínicos e quimolínicos, comparando com o fármaco de referência para doença de Chagas, o Bz;
- d) Determinar a janela terapêutica dos compostos testados (índice de seletividade; IS) visando definir os mais promissores;
- e) Analisar perfil de toxicidade aguda dos compostos selecionados para estudos *in vivo* através de análise sobre modelos murinos
- f) Investigar o perfil de eficácia *in vivo* dos agentes selecionados a partir dos estudos anteriores sobre modelos experimentais de infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi*, comparando em paralelo com o Bz.

3. ARTIGO PUBLICADO

O trabalho a seguir intitula-se “Anti-parasitic Effect of Novel Amidines Against *Trypanosoma cruzi*: Phenotypic and *In silico* Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity Analysis” que foi desenvolvido durante o período do mestrado em concordância com os objetivos da presente dissertação. Nele foi investigada a ação tripanocida de nove amidinas aromáticas (DB2228, DB2229, DB2292, DB2294, DB2232, DB2235, DB2251, DB2253 e DB2255) sobre as formas parasitárias mais relevantes para infecção humana, a tripomastigota sanguínea e a amastigota intracelular, utilizando diferentes cepas representantes de distintos DTU's (II e VI). Esta classe de compostos também foi avaliada quanto ao seu possível perfil de toxicidade sobre células de mamífero hospedeiras, além de ensaios de ADME *in silico*. No artigo também foi determinada a janela terapêutica dos compostos, através do cálculo de índice de seletividade. O artigo foi publicado na revista online Parasitology Open Access. O estudo começa na página 31 e termina na página 51.

**Anti-parasitic Effect of Novel Amidines Against *Trypanosoma cruzi*:
Phenotypic and *In silico* Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and
Toxicity Analysis**

Aline Silva da Gama Nefertiti^a, Marcos Meuser Batista^a, Patricia Bernardino Da Silva^b, Eduardo Caio Torres-Santos^b, Edézio F. Cunha-Junior^b, Julius Green^c, Arvind Kumar^c, Abdelbasset A. Farahat^{c, d}, David W. Boykin^c and Maria de Nazaré Correia Soeiro^{*a}.

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

^bLaboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^cDepartment of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, Georgia, USA

^dDepartment of Pharmaceutical Organic Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mansoura University, Mansoura 35516, Egypt.

Running title: Aromatic amidines against *T.cruzi*

* 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)

SUMMARY

New more selective and potent drugs are urgently need to treat Chagas disease. Among the many synthetic compounds evaluated against *T. cruzi*, aromatic amidines (AA) and especially arylimidamides (AIAs) have potent activity against this parasite. Presently, the effect of four mono-amidines (DB2228, DB2229, DB2292 and DB2294), four diamidines (DB2232, DB2235, DB2251 and DB2253) and one AIA (DB2255) was screened *in vitro* against different forms (bloodstream trypomastigotes – BT and intracellular forms) and strains from DTU I and VI) of *T. cruzi* and their cytotoxic profile on mammalian host cells. Except for DB2253, all molecules were as active as Bz, resulting in 50% of reduction in the number of alive BT, with EC₅₀ ranging from 2.7 - 10.1 μM after 24h of incubation. DB2255 was also the most potent against amastigotes (Tulahuen strain) showing similar activity to that of Bz (3 μM). *In silico* absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) analysis demonstrated probability of human intestinal adsorption, while mutagenicity and inhibition of hERG1 were not predicted, besides giving acceptable predicted volumes of distribution. Our findings contribute for better knowledge regarding the biological effect of this class of aromatic molecules against *T.cruzi* aiming to identify novel promising agent for Chagas disease therapy.

Key-words: Aromatic amidines; Chagas disease; Experimental chemotherapy, Toxicity; Selectivity, *In silico* ADMET analysis

KEY FINDINGS

- Aromatic amidines (AA) are able to kill bloodstream trypomastigotes as soon as after 2 h of drug incubation.
- Most of the studied molecules presented anti-trypomastigote activity.
- ADMET properties of the most active compounds predicts good adsorption by human intestines.

INTRODUCTION

Over 100 years ago, Carlos Chagas, a Brazilian researcher discovered a new disease, American trypanosomiasis or Chagas disease (CD) caused by a flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*. CD is endemic to 21 countries of Latin American, affecting more than 6 million individuals (WHO, 2016).

CD is currently emerging in non-endemic areas, such as North America, Europe and Oceania, mostly associated with the migration of infected carriers (Albajar-Viñas and Dias, 2014). CD presents in two stages: an acute and a later chronic phase, which after years or decades about 30-40 % of patients progress to symptomatic forms, causing heart disease and / or digestive and neurological disorders (Teixeira, Nascimento, Sturm, 2006; Marin-Neto *et al.* 2008; Coura and Dias, 2015). The two drugs currently available for clinical treatment are the nitroderivates, nifurtimox (Nif) and benznidazole (Bz), were introduced about four decades ago into clinical use and up to now remain the only treatment options (Patterson and Wyllie, 2014) . The major limitations of these compounds include the need for long time administration and their considerable side effects that in some cases leads to the discontinuation of treatment, therapeutic failure at the later chronic phase and exhibition of limited effectiveness against naturally resistant strains (Wilkinson *et al.* 2008). A novel candidate for CD therapy should present as drug characteristics: (i) efficacy upon the two phases of the disease, especially the later chronic stage, (ii) potency on different parasite discrete typing units (DTUs; I, II, V and VI) and forms relevant for human infection (trypomastigotes and amastigotes), (iii) low toxicity and absence of genotoxicity, mutagenicity and cardiotoxicity, (iv) be orally administrated, (v) with good stability (3-5 years in climatic zone) with (vi) low costs (Chatelain & Konar, 2015; DNDi, 2016).

A recent clinical trial, which included a 5-year follow-up, seeking the benefits of the trypanocidal therapy using Bz in patients with established Chagas' cardiomyopathy showed that although there was a significant reduction in total parasite load, this drug was not able to impair cardiac clinical deterioration (Morillo *et al.* 2015). These findings corroborate the need to find alternative therapies for CD. Aromatic amidines (AA) are dicationic molecules with many of them such as pentamidine (Pt) presenting DNA minor groove-binding characteristics (Soeiro *et al.* 2013). The anti-parasitic action of Pt has been known since 1937 (King, Lourie and Yorke, 1937) and in the ensuing years many analogues and derivatives have been synthesized and screened against parasitic organisms. Several of these molecules have demonstrated a wide spectrum of activity against human and veterinary pathogens such as leishmaniasis, human African trypanosomes and *T.cruzi* (Soeiro *et al.* 2013; De Souza *et al.* 2004; Soeiro *et al.* 2008; De Araújo *et al.* 2014). Among novel amidine molecules, the arylimidamides have shown very promising profiles and potent activity against intracellular parasites like *Neospora caninum*, *Leishmania sp* and *T.cruzi* (Soeiro *et al.* 2013). The present study investigates the anti-*T.cruzi* activity of additional novel amidines (four mono-amidines, four diamidines and one arylimidamide) through phenotypic studies *in vitro* by assessing different forms and parasite strains besides determining their toxicity towards different host cell types (as L929 cell lines and primary cultures of cardiac cells) and their ADMET properties from *in silico* predictions.

MATERIAL AND METHODS

Compounds: The synthesis of the four studied mono-amidines (2 - (5 - (4 - ((1- (quinolin- 4 - yl) -1H -1,2,3- triazol - 4 - yl) methoxy) phenyl) thiophen - 2- yl) - 1H- benzo[d]imidazole- 6 - carboximidamide hydrochloride (DB2228), 2- (5 -(4 - ((1 - (2 - (naphthalen-1 - yl) ethyl) - 1H -1,2,3 – triazol - 4- yl) methoxy) phenyl) thiophen - 2- yl) - 1H - benzo[d]imidazole – 6 - carboximidamide hydrochloride (DB2229), 2- (5 - 4 - ((1 - (2 - (2 - (naphthalene – 2 - yloxy) ethoxy) ethyl) - 1H - 1,2,3-triazol - 4 - yl) methoxy) phenyl) thiophen- 2- yl - 1H - benzo[d]imidazole – 6 - carboximidamide hydrochloride (DB2292) and 2-(5 - (4-((1- (2- (2- (2- (naphthalene – 2 - yloxy) ethoxy) ethoxy) ethyl) - 1H -1,2,3- triazol - 4-yl) methoxy) phenyl) thiophen- 2- yl) -1H- benzo[d]imidazole – 6 - carboximidamide

hydrochloride (DB2294) has been previously described (Green, 2014). The synthetic route of the four diamidines (2,2' - ((propane -1,3 -diylbis (oxy)) bis (4,1-phenylene)) bis (1H - benzo[d]imidazole – 6 -carboximidamide) dihydrochloride (DB2232), 4,4'-(1-phenyl - 1H-pyrrole - 2,5 -diyl) dibenzimidamide dihydrochloride (DB2235), 2,2'- ((1-phenyl -1 H- pyrrole-2,5-diyl) bis (4,1-phenylene)) bis (4,5-dihydro-1H-imidazole) dihydrochloride (DB2251), 2,2'- ((1-phenyl- 1H- pyrrole - 2,5-diyl) bis (4,1-phenylene)) bis (1, 4, 5, 6- tetrahydropyrimidine) dihydrochloride (DB2253)) was also conducted using a methodology previously reported (Farahat *et al.* 2011; Ismail *et al.* 2004). The synthesis of the bis-AIA N, N''- ((2-oxoimidazolidine -1,3- diyl) bis (3 – isopropoxy - 4,1- phenylene)) dipicolinimidamide dihydrochloride (DB2255) was previously reported (Stephens *et al.* 2001) (Figure 1). All compounds have been fully characterized by spectral methods (nuclear magnetic resonance (NMR) and mass spectrometry (MS) and by satisfactory C, H, N analysis. Benzimidazole (Bz) (2-nitroimidazole; Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco [LAFEPE], Brazil) was used as reference drug. Stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) with the final concentration of the solvent never exceeding 0.6% DMSO, which is not toxic to the parasite and mammalian cells.

Parasites: Bloodstream trypomastigote (BT) forms of the Y strain were obtained from the blood samples of infected albino Swiss mice at the peak of parasitemia. The purified parasites were resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum as reported previously (Batista *et al.* 2010). Trypomastigotes of Tulahuen strain expressing the *Escherichia coli* β -galactosidase gene (Buckner *et al.* 1996) were collected from the supernatant of infected cell cultures (L929 culture) as reported (Romanha *et al.* 2010).

Cell cultures: For the toxicity assays on mammalian cells, primary cultures of cardiac cells were obtained from mice embryos plated onto coverslips in 96 well plates previously coated with 0.01% gelatin (Meirelles *et al.* 1986). L929 cell lineages were obtained as described and maintained in RPMI-1640 medium (pH 7.2-7.4) without phenol red (Gibco BRL) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 2 mM glutamine (RPMI), as reported previously (Romanha *et al.* 2010).

Cytotoxicity *in vitro* tests: The cardiac cells were incubated for 24 h at 37°C with different concentrations of each compound diluted in RPMI and then, the morphology, cell density and spontaneous contractibility evaluated by light microscopy and their cellular viability determined by the Presto Blue test as reported (Timm *et al.* 2014). L929 cell lineages incubated for 24 and 96 h at 37°C, with different concentrations of each compound diluted in RPMI and their cellular viability determined by the AlamarBlue test as reported (Timm *et al.* 2014). The maximum concentration of each compound was 96 µM due to molecule precipitation. The results expressed by following the manufacturer instructions and the value of CC₅₀ that corresponds to the concentration that reduces in 50% the cellular viability, determined. Selective index (SI) expressed by ratio between the values obtained for CC₅₀ over the host cells and the EC₅₀ obtained over the parasites.

Trypanocidal activity: Bloodstream trypomastigotes (BT) of the Y strain (DTU II) (Zingales *et al.* 2009) (5×10^6 per mL) were incubated for 2 and 24 h at 37°C in RPMI in the presence or not of serial dilution of the compounds (up to 32µM). After compound incubation, the death parasite rates were determined by light microscopy through the direct quantification of the number of live parasites using a Neubauer chamber, and the EC₅₀ concentration (the compound concentration that reduces in 50% the number of parasites) was calculated (Timm *et al.* 2014). For the assay on intracellular forms, culture-derived trypomastigotes of *T. cruzi* (Tulahuen strain expressing β-galactosidase; DTU VI,) (Zingales *et al.* 2009) used to infect L929 infected-cells cultures using a ratio of 10:1 (parasite: host cell). After 2h, the cultures rinsed and further incubated for 48 h for establishment of the infection. Then, the compounds were added (initially using a fixed concentration of 10 µM followed by other set of assays using increasing non-toxic concentrations to the mammalian host cell for determination of EC₅₀ values) and the cultures maintained at 37°C for 96 h. After addition of 50 µL of the substrate ((CPRG - chlorophenol red glycoside) 500 mM) in 0.5% Nonidet P40 and incubation at 37°C for 18 h, the absorbance at 570 nm was measured, and the results expressed as percent of parasite growth inhibition (Romanha *et al.* 2010).

In all assays, at least three experiments ($n \leq 3$) were done using ≤ 2 replicates.

Computational assessment of the drug-like properties of the tested compounds: Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) properties of the studied amidines evaluated using the pkCSM approach, which uses graph-based signatures to develop predictive ADMET (Pires, Blundell, Ascher, 2015).

Statistical Analysis: Statistical analysis was performed using Student's *t*-test with significance set at $p \leq 0.05$.

Ethics: All procedures were conducted in accordance with the guidelines established by the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA LW16/14).

RESULTS

Initially, the biological assays were carried out to evaluate the activity of these molecules upon BT forms (Y strain – DTU II), and their respective toxicity towards cardiac cells. Our findings demonstrate that after a short period of incubation (2 h), six out of the nine drugs demonstrate trypanosomicidal activity against BT, exhibiting EC_{50} values lower than 20 μM , while Bz was inactive (Table 1). DB2229 and DB2294 displayed an EC_{90} value $<10 \mu\text{M}$ after only 2 h of compound treatment (Table 1) presenting a fast activity towards these forms. After 24 h, seven molecules (DB2228, DB2229, DB2232, DB2235, DB2255, DB2292 and DB2294) were more potent ($EC_{50} \leq 8.3 \mu\text{M}$) than Bz (9.6 μM), being DB2292 about 3-fold more active than the reference drug (Table 1). The toxicity profile assessed using cardiac cell cultures to exclude compounds and concentrations that presented cardiotoxic characteristics evaluated by morphological, contractility and density analysis besides through cellular viability approach using a colorimetric methodology (PrestoBlue). Only DB2235 and DB2251 presented detectable toxicity up to the studied concentrations ($CC_{50} = 49 \pm 21 \mu\text{M}$ and $62 \pm 23 \mu\text{M}$, respectively) (Table 1).

Next, further assays analysed the activity on intracellular forms of *T. cruzi*, using the Tulahuen strain transfected with β -galactosidase, as previously reported (Romanha *et al.* 2010). The trypanocidal action after 96 h of incubation using a fixed concentration of 10 μ M showed that only the AIA DB2255 displayed a high inhibition of the parasite growth (88%), reaching similar activity to that of Bz (Table 2). Therefore, DB2255 was the only molecule selected for the next screening step, consisting of infection of L929 cells followed by incubation with non-toxic concentrations (up to 32 μ M). DB2255 and Bz presented similar potency (EC_{50} values of $3.6 \pm 0.39 \mu$ M and $3 \pm 1 \mu$ M, respectively), but the reference drug exhibited higher selectivity (data not shown).

Mathematic parameters of drug likeness including, absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity properties were calculated using the pkCSM approach that uses graph-based signatures to develop predictive of ADMET (Pires, Blundell, Ascher, 2015). *In silico* absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) analysis demonstrated probability of human intestinal adsorption (greater than 90%), while mutagenicity and inhibition of hERG1 were not predicted, besides giving acceptable predicted volumes of distribution (Tables 3 and 4).

DISCUSSION

In the last 40 years the only available treatment for Chagas disease has been two nitroheterocyclic agents, benznidazole and nifurtimox, despite their severe side effects and low efficiency during the later chronic phase (Wilkinson and Kelly, 2009; Don and Ioset, 2013). The limitations of these therapies highlight the urgent need to find more effective and safer new compounds. Many compounds have been developed and screened with different experimental models of neglected diseases including Chagas disease (Bilbe, 2015). The azole anti-fungal inhibitors posaconazole (Pos) and ravuconazole (Rav) that act on the sterol 14 α -demethylase (CYP51) enzyme although were very potent *in vitro* and *in vivo* (using dog and mouse models) (Urbina *et al.* 1998; Diniz *et al.* 2010; Keenan and Chaplin, 2015;) unfortunately failed during clinical trials performed by the Drugs for Neglected Diseases initiative (Molina *et al.* 2014). In addition, another recent clinical trial called “Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis” (BENEFIT) designed to evaluate the efficacy and safety of Bz compared to

placebo, did not demonstrate protection by this drug against clinical outcomes among patients with chronic Chagas disease. Often, in drug development for Chagas disease, as well as for other pathologies, there is a lack of direct translation between pre-clinical *in vitro* and *in vivo* results and clinical outcomes. Experimental chemotherapy for Chagas disease presents serious challenges in part due to experimental difficulties related to reliable demonstration of a sterile cure, particularly during the chronic stage of infection when parasite burden is low and tissue distribution is not fully understood (Francisco *et al.* 2015; Chatelain and Konar, 2015).

Our group has studied the *in vitro* and *in vivo* activity of aromatic amidines and analogues and the bulk of the data revealed very promising action of these cations against intracellular pathogens, including *T. cruzi* (Soeiro *et al.* 2013). Presently, nine aromatic compounds were evaluated by phenotypic and *in silico* studies. The mono-amidines (DB2228, DB2229, DB2292 and DB2294) with tethered aryl rings chosen due to previous observation that this class display potent effect against this parasite (Simões-Silva *et al.* 2016). Three of the four diamidines (DB2235, DB2251 and DB2253) are analogues of furamidine and one (DB2232) is an extended bis-amidino benzimidazole, which represents another class of highly active diamidines. Lastly, one novel bis-arylimidamide (DB2255) results from a simple modification of the structure of the highly active anti-*T. cruzi* compound DB766 (Batista *et al.* 2010). In DB2255, the central furan ring of DB766 replaced with a non-aromatic 5-membered imidazolidin-2-one ring.

Results of calculations using the pkCSM approach for estimation of ADMET and other drug-like properties are important to consider at an early stage in the drug discovery process (Pires, Blundell, Ascher, 2015). The *in silico* estimation of ADMET properties showed that only DB2229, DB2235, DB2251 and DB2253 are likely to permeate Caco2 cells, with values near of the adopted threshold of 0.9. In addition, DB2228, DB2229, DB2251, DB2253, DB2255, DB2292 and DB2294 are predicted to show good adsorption (above 90%) by human intestines and reasonable predicted volume of distribution. Regarding the toxicity predictors, none expected to be mutagenic nor inhibitors of hERG1 whereas all compounds are expected to inhibit hERG2 and have hepatotoxic profile as has also the reference drug, benznidazole.

Regarding the biological phenotypic assays, seven of out nine amidines presently screened against bloodstream forms resulted in parasite death rates

similar to Bz including mono-amidines DB2228, DB2229, DB2292, DB2294, diamidines DB2232, DB2235 and AIA DB2255. Another important characteristic of some (DB2228, DB2229, DB2235, DB2292 and DB2294) was the ability to fast kill the parasite exhibiting anti-trypomastigote activity after 2 h of exposure while Bz was completely inactive at this time of drug exposure. When these aromatic compounds were tested against the intracellular amastigotes the bis-AIA DB2255 that was one of the best molecules against BT forms, also presented anti-parasitic effect in the same range as Bz, even using a different parasite strain and DTUs (Y and Tulahuen for BT and intracellular forms, corresponding to DTU II and VI, respectively). These data corroborate our previous findings that demonstrated the promising trypanocidal phenotypic effect of bis-AIAs (De Araujo *et al.* 2014; Timm *et al.* 2014). Data using trypomastigotes collected from infected cell lines reported EC₅₀ values of 2.8 µM and 15.2 µM for pentamidine exposure using Y and Dm28c strains, respectively (Diaz *et al.*, 2014). However, DB2255 was less potent than other studied AIAs such as DB766 which gives EC₅₀ values at < 0.1 µM (Batista *et al.* 2010). This result demonstrates that to achieve high anti-*T. cruzi* activity using the DB766 scaffold a central five membered hetero aromatic ring is required. In addition, is important to take into consideration that a hit compound for CD must be active against both parasite stages and upon the different DTUs in order to be given in the distinct endemic areas of this neglected disease (Chatelain, 2015).

ACKNOWLEDGMENTS: The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities.

FINANCIAL SUPPORT: The present study was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, PROEP/CNPq/Fiocruz. MNCS is research fellow of CNPq and CNE research. This work was also supported, in part, by the National Institutes of Health USA Grant No.RO1AI64200 and by The Bill and Melinda Gates Foundation through a subcontract with the CPDD (to D.W.B.).

CONFLICT OF INTEREST

None

REFERENCES

Albajar-Viñas, P. and Dias, J.C. (2014). Advancing the treatment for Chagas' disease. *New England Journal of Medicine* **15**, 1942-3.

Batista, D.G., Batista, M.M., de Oliveira, G.M., do Amaral, P.B., Lannes-Vieira, J., Britto, C.C., Junqueira, A., Lima, M.M., Romanha, A.J., Sales Junior, P.A., Stephens, C.E., Boykin, D.W. and Soeiro, M. N. (2010). Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. 2010. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 2940-52.

Bilbe G. (2015). Infectious diseases. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. *Science* **29**, 974-6. doi: 10.1126/science.aaa3683.

Buckner, F.S., Verlinde, C.L.M.J., La Flamme, A.C. and van Voorhis, W.C. (1996). Efficient technique for screening drugs activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing b-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **40**, 2592-2597.

Chatelain, E. and Konar, N. (2015). Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Journal of Drug Design Development and Therapy* **19**, 4807-23.

Chatelain, E. (2015). Chagas disease drug discovery: toward a new era. *Journal of Biomolecular Screening* **20**, 22-35.

Coura, J.R. and Dias, J.C. (2015). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **104**, (Suppl.) 1: 31-40.

De Araújo, J.S., Da Silva, C.F., Batista, D.G., Da Silva, P.B., Meuser, M.B., Aiub, C.A., da Silva, M.F., Araújo-Lima, C.F., Banerjee, M., Farahat, A.A., Stephens, C.E., Kumar, A., Boykin, D.W. and Soeiro MN. (2014). *In vitro* and *in vivo* studies of the biological activity of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 4191-5.

De Souza, E.M., Lansiaux, A., Bailly, C., Wilson, W.D., Hu, Q., Boykin, D.W., Batista, M.M., Araújo-Jorge, T.C. and Soeiro, M.N. (2004). Phenyl substitution of furamidine markedly potentiates its anti-parasitic activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*. *Biochemical Pharmacology Journal* **15**, 593-600.

Díaz, M.V., Miranda, M.R., Campos-Estrada, C., Reigada, C., Maya, J.D., Pereira, C.A., López-Muñoz, R. (2014) Pentamidine exerts *in vitro* and *in vivo* anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica Journal* **134**,1-9.

Diniz, L. de F., Caldas, I.S., Guedes, P.M., Crepalde, G., de Lana, M., Carneiro, C.M., Talvani, A., Urbina, J.A. and Bahia, M.T. (2010). Effects of ravuconazole treatment on parasite in dogs experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **54**, 2979-86.

Drugs for Neglected Diseases Initiative (2016). Chagas Disease Target Product Profile. Available in: <http://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio.html>. Accessed June 4, 2016.

Don, R. and Ioset, J.R. (2013). Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* **141**,140-6.

Francisco, A.F., Lewis, M.D., Jayawardhana, S., Taylor, M.C., Chatelain, E. and Kelly, J.M. (2015). Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive *In Vivo* Imaging. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**, 4653-61.

Farahat, A.A., Paliakov, E., Kumar, A., Barghash, A.E., Goda, F.E., Eisa, H.M., Wenzler, T., Brun, R., Liu, Y., Wilson, W.D. and Boykin, D.W.. (2011). Exploration of larger central ring linkers in furamidine analogues: synthesis and evaluation of their DNA binding, antiparasitic and fluorescence properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **1**, 2156-67.

Green, J. (2014). "Synthesis of Aza-Heterocyclic Monoamidines as Potential DNA Minor Groove Binders, Anti-Trypanosomals, and Boron Neutron Capture Therapy Agents." Dissertation, Georgia State University. (http://scholarworks.gsu.edu/chemistry_diss/101). Accessed December 2015.

Ismail, M.A., Brun, R., Wenzler, T., Tanious, F.A., Wilson, W.D. and Boykin, D.W. (2004). Dicationic biphenyl benzimidazole derivatives as antiprotozoal agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **15**, 5405-13.

Keenan, M. and Chaplin, J.H. (2015). A new era for chagas disease drug discovery? *Progress in Medicinal Chemistry* **54**, 185-230.

King, H., Lourie, E.M. and Yorke, W. (1937). New trypanocidal substances. *The Lancet* **230**, 1360 – 136.

Marin-Neto, J.A., Rassi, A.Jr., Morillo, C.A., Avezum, A., Connolly, S.J., Sosa-Estani, S., Rosas, F., Yusuf, S. and BENEFIT, I. (2008). Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *American Heart Journal* **156**, 37-43.

Meirelles, M.N., de Araujo-Jorge, T.C., Miranda, C.F., de Souza, W. and Barbosa, H.S. (1986). Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *European Journal of Cell Biology* **41**, 198-206.

Molina, I., Gómez, i Prat.J., Salvador, F., Treviño, B., Sulleiro, E., Serre, N., Pou, D., Roure, S., Cabezos, J., Valerio, L., Blanco-Grau, A., Sánchez-Montalvá, A., Vidal, X. and Pahissa, A. (2014). Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *New England Journal Of Medicine* **15**, 1899-908.

Morillo, C.A., Marin-Neto, J.A., Avezum, A., Sosa-Estani, S., Rassi, A.Jr., Rosas, F., Villena, E., Quiroz, R., Bonilla, R., Britto, C., Guhl, F., Velazquez, E., Bonilla, L., Meeks, B., Rao-Melacini, P., Pogue, J., Mattos, A., Lazdins, J., Rassi, A., Connolly, S.J., Yusuf, S and BENEFIT, I. (2015). Randomized Trial of

Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *New England Journal Of Medicine* 373, 1295-306.

Patterson, S. and Wyllie, S. (2014). Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends in Parasitology* 30, 289-98.

Pires, D.E., Blundell, T.L. and Ascher, D.B. (2015). pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *Journal of Medicines Chemistry* 14, 4066-72.

Romanha, A.J., Castro, S.L., Soeiro, M. N., Lannes-Vieira, J., Ribeiro, I., Talvani, A., Bourdin, B., Blum, B., Olivieri, B., Zani, C., Spadafora, C., Chiari, E., Chatelain, E., Chaves, G., Calzada, J.E., Bustamante, J.M., Freitas-Junior, L.H., Romero, L.I., Bahia, M.T., Lotrowska, M., Soares, M., Andrade, S.G., Armstrong, T., Degraeve, W. and Andrade, Z. A. (2010).

Degraeve, W. and Andrade, Z. A. (2010). In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 105, 233-8.

Simões-Silva, M.R., Nefertiti, A.S.G., De Araújo, J.S., Batista, M.M., Da Silva, P.B., Bahia, M.T., Menna-Barreto, R.S., Pavão, B.P., Green, J., Farahat, A.A., Kumar, A., Boykin, D.W. and Soeiro, M.N.C. (2016). Phenotypic Screening *In Vitro* of Novel Aromatic Amidines Against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 60, 4701-4707.

Soeiro, M.N., Werbovetz, K., Boykin, D.W., Wilson, W.D., Wang, M.Z. and Hemphill, A. (2013). Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology* 140, 929-51.

Soeiro, M.N., de Castro, S.L., de Souza, E.M., Batista, D.G., Silva, C.F. and Boykin, D.W. (2008). Diamidine activity against trypanosomes: the state of the art. *Current Molecular Pharmacology* 1, 151-61.

Stephens, C.E., Tanious, F., Kim, S., Wilson, W.D., Schell, W.A., Perfect, J.R., Franzblau, S.G. and Boykin, D.W. (2003). Diguanidino and "reversed" diamidino 2,5-diarylfurans as antimicrobial agents. *Journal of Medicinal Chemistry* **24**, 1741-8.

Teixeira, A.R., Nascimento, R.J., Sturm, N.R. (2006). Evolution and pathology in chagas disease--a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **101**, 463-91.

Timm, B.L., da Silva, P.B., Batista, M.M., da Silva, F.H., da Silva, C.F., Tidwell, R.R., Patrick, D.A., Jones, S.K., Bakunov, S.A., Bakunova, S.M. and Soeiro, M. N. (2014). *In vitro* and *in vivo* biological effects of novel arylimidamide derivatives against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 3720-6.

Urbina, J.A., Payares, G., Contreras, L.M., Liendo, A., Sanoja, C., Molina, J., Piras, M., Piras, R., Perez, N., Wincker, P. and Loebenberg, D. (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **42**, 1771-7.

Wilkinson, S.R., Taylor, M.C., Horn, D., Kelly, J.M. and Cheeseman, I.A. (2008). A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5022-7.

Wilkinson, S.R. and Kelly, J.M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine Journal* **11**, 1-25.

World Health Organization (2016). What is Chagas Disease? (WHO) Third WHO Report on Neglected Tropical Diseases. Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization, Geneva.

Zingales, B., Andrade, S.G., Briones, M.R., Campbell, D.A., Chiari, E., Fernandes, O., Guhl, F., Lages-Silva, E., Macedo, A.M., Machado, C.R., Miles, M.A., Romanha, A.J., Sturm, N.R., Tibayrenc, M., Schijman, A.G.; Second Satellite Meeting. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific

nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104, 1051-4.

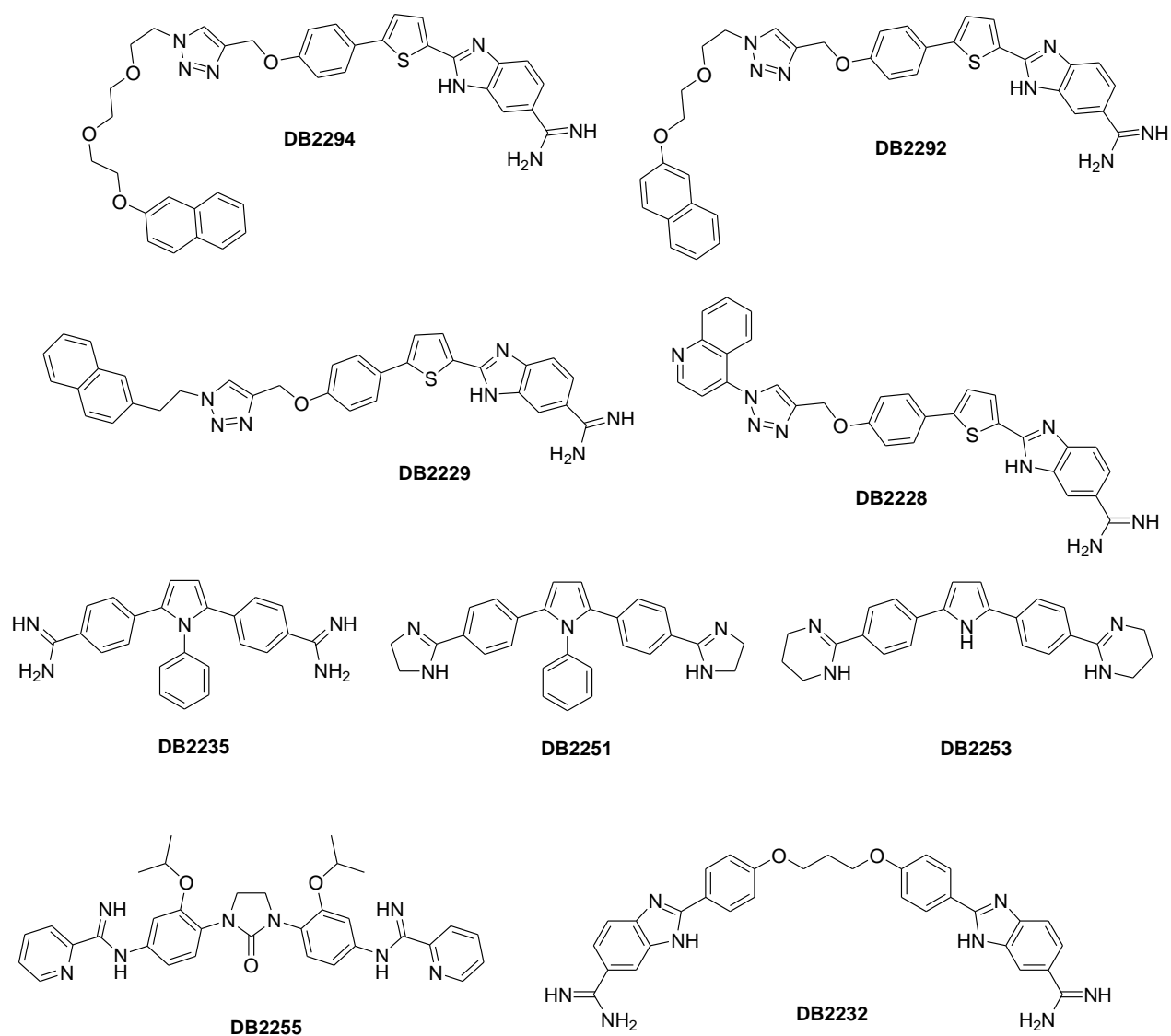


Figure 1: Chemical structure of the nine selected amidines assayed in this work.

Table 1: *In vitro* activity of the amidines and benznidazole on bloodstream trypomastigotes of the Y strain and on cardiac cells : EC₅₀ and EC₉₀ values after 2 and 24 hours, CC₅₀ values of CC after 24h of incubation at 37 °C, respectively, and the corresponding selectivity index (SI).

| Compound | EC ₅₀ (mean ± SD) μM | | EC ₉₀ (mean ± SD) μM | | CC ₅₀ (mean ± SD) μM | SI* 24 h |
|----------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|-------------|---------------------------------|----------|
| | 2 h | 24 h | 2 h | 24 h | 24 h | |
| Bz | >32 | 9.6 ± 1.4 | >32 | 30.6 ± 0.64 | >1000 | >104 |
| DB2228 | 9.3 ± 0.75 | 8.3 ± 3.2 | >32 | 25.9 ± 4.2 | >96 | >12 |
| DB2229 | 6.3 ± 3.7 | 2.7 ± 0.3 | 9.8 ± 1.3 | 8.1 ± 1.37 | >96 | >36 |
| DB2292 | 7.2 ± 1 | 3.1 ± 0.9** | 24.4 ± 1.5 | 10.8 ± 2.9 | >96 | >31 |
| DB2294 | 5.2 ± 2.9 | 3.9 ± 1.3** | 9.6 ± 1.7 | 9 ± 0.5 | >96 | >25 |
| DB2232 | 19.6 ± 0.3 | 7.4 ± 0.6 | >32 | 30.6 ± 1.1 | >96 | >13 |
| DB2235 | >32 | 5.27 ± 3.7 | >32 | 10.3 ± 0.35 | 49 ± 21 | 9 |
| DB2251 | >32 | 10.1 ± 2.5 | >32 | 28.9 ± 1.8 | 62 ± 23 | 6 |
| DB2253 | >32 | 19 ± 8 | >32 | >32 | >96 | >5 |
| DB2255 | 5.5 ± 2.25 | 3.6 ± 2.4** | >32 | 6.46 ± 3.2 | >96 | >27 |

* based on EC₅₀ 24h

**Student's t-test statistical analysis of studied compound and Bz: ($p < 0.05$)

Table 2: Table 2: Activity of the amidines and benznidazole on L929 cell lines infected with *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain transfected with β -galactosidase) after 96 hours of incubation with 10 μ M of each compound.

| Compounds | % of parasite growth inhibition | CC₅₀ |
|------------------|--|------------------------|
| Bz | 83 \pm 5 | >100 |
| DB2228 | 46 \pm 18 | >96 |
| DB2229 | 50 \pm 10 | >96 |
| DB2292 | 39 \pm 22 | >96 |
| DB2294 | 7 \pm 5 | >96 |
| DB2232 | 22 \pm 10 | >96 |
| DB2235 | 58 \pm 14 | >96 |
| DB2251 | 70 \pm 17 | >96 |
| DB2253 | 70 \pm 17 | >96 |
| DB2255 | 88 \pm 11 | >96 |

Table 3: *In silico* ADME.

| | DB2229 | DB2232 | DB2235 | DB2251 | DB2253 | DB2255 | DB2292 | DB2294 | BZ | |
|----------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| ABSORPTION | | | | | | | | | | |
| Caco2 permeability (log cm/s) | 0.316 | 0.858 | 0.086 | 0.824 | 1.124 | 0.998 | 0.026 | 0.163 | 0.199 | 0.479 |
| Intestinal absorption (human, %) | 97.185 | 100 | 86.259 | 82.685 | 94.223 | 93.881 | 90.08 | 96.671 | 93.916 | 68.885 |
| Skin Permeability (logKp) | -2.741 | -3.011 | -2.947 | -3.713 | -3.51 | -3.629 | -2.838 | -2.818 | -2.759 | -2.893 |
| DISTRIBUTION | | | | | | | | | | |
| VDss (human) (log VDss (L/kg)) | 0.645 | 0.709 | 0.318 | 0.482 | 0.93 | 0.705 | 0.449 | 0.573 | 0.521 | -0.104 |
| Fraction unbound (human) | 0.307 | 0.2 | 0.278 | 0.35 | 0.278 | 0.316 | 0.187 | 0.213 | 0.221 | 0.503 |
| BBB permeability | -1.185 | -0.85 | -1.086 | -0.157 | 0.13 | 0.007 | -1.265 | -1.249 | -1.465 | -0.619 |
| CNS permeability | -1.913 | -2.298 | -2.944 | -2.439 | -2.095 | -2.151 | -2.526 | -2.766 | -3.072 | -2.995 |
| METABOLISM | | | | | | | | | | |
| CYP2D6 substrate | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| CYP3A4 substrate | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No |
| CYP1A2 inhibitor | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| CYP2C19 inhibitor | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| CYP2C9 inhibitor | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| CYP2D6 inhibitor | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| CYP3A4 inhibitor | Yes | Yes | Yes | No | Yes | No | Yes | Yes | Yes | No |
| EXCRETION | | | | | | | | | | |
| Total Clearance log(ml/min/kg) | 1.117 | 1.322 | 1.74 | 1.177 | 0.598 | 0.628 | 0.605 | 1.459 | 1.649 | 0.625 |

Table 4: *In silico* toxicity.

| | DB2228 | DB2229 | DB2232 | DB2235 | DB2251 | DB2253 | DB2255 | DB2256 | DB2292 | DB2294 | Bz |
|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-----|
| AMES toxicity | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | Yes |
| Max. tolerated dose (human) (log mg/kg/day) | 0.346 | -0.896 | -0.719 | -0.109 | -0.494 | -0.233 | -0.624 | -0.838 | -0.741 | 0.984 | |
| HERG I inhibitor | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| HERG II inhibitor | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | No |
| Oral Rat Acute Toxicity (LD50) (mol/kg) | 2.776 | 3.007 | 2.577 | 2.451 | 2.887 | 2.785 | 2.841 | 2.758 | 2.53 | 2.454 | |
| Oral Rat Chronic Toxicity (LOAEL) log(mg/kg_bw/day) | 2.577 | 0.514 | 0.981 | 1.483 | 1.085 | 1.213 | 0.407 | 0.471 | 0.436 | 1.649 | |
| Hepatotoxicity | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes | Yes |
| Skin Sensitisation | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No | No |
| <i>T. Pyriformis</i> toxicity p(GG50 (log ug/L) | 0.285 | 0.3 | 0.308 | 0.946 | 0.475 | 0.807 | 0.329 | 0.29 | 0.287 | 1.227 | |
| Milnnow toxicity log LC50 (mM) | 0.276 | 0.125 | 0.822 | 1.156 | 0.726 | 0.925 | -0.069 | -0.025 | -0.19 | 1.649 | |

4. ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO

O trabalho a seguir intitula-se “Effect of Novel Quinolines Against *Trypanosoma cruzi* infection *In vitro* and *In vivo*” foi desenvolvido durante o período do mestrado em concordância com os objetivos da presente dissertação. Nele é investigada a ação tripanocida de nove quinolinas (DB2104, DB2131, DB2161, DB2171, DB2186, DB2191, DB2192, DB2212 e DB2217) sobre as diferentes formas parasitárias do *T. cruzi* (a tripomastigota não multiplicativa e a amastigota intracelular multilicativa) e cepas de dois DTU’s (II e VI). Esta classe de compostos também foi avaliada quanto ao seu possível perfil de toxicidade sobre células de mamífero hospedeiras. No artigo também foi determinada a janela terapêutica dos compostos, através do cálculo de índice de seletividade e os mais promissores seguiram para ensaios *in vivo*. O artigo foi aceito para publicação na revista *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. O estudo começa na página 53 e termina na página 76.

Effect of Novel Quinolines Against *Trypanosoma cruzi* infection *In vitro* and *In vivo*

Nefertiti, ASG^a, Batista, MM^a, Da Silva, PB^a, Batista, DGJ^a, Da Silva, CF^a, Torres-Santos, EC^b, Cunha-Junior, EF^b, Boykin, DW^c and Soeiro, MNC^a

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

^bLaboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil.

^cDepartment of Chemistry, Georgia State University, Atlanta, Georgia, USA.

Abstract

Recent clinical trials on chronic chagasic patients revealed the therapeutic failure of two promising triazoles inhibitors of CYP51 enzymes. Also, another study using benznidazol (Bz), which is the available drug to treat Chagas disease, demonstrated its inability to arrest cardiac disease progression. Thus, both claim and justify the search for novel therapeutic options for the millions of individuals affected by this silent neglected pathology caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*. Presently, the biological effect of nine novel quinolines was evaluated through *in silico* and by phenotypic studies using both *in vitro* and *in vivo* models of *T.cruzi* infection. The analysis of some ADMET properties through the pkCSm tool revealed that except for some LogP values, all molecules did not infringe the Lipinski's rule, which is a predictive of good oral absorption. The quinolines showed good probability of permeability on Caco cells and human intestinal absorption with better oral absorption profile than Bz, besides low probability of mutagenicity and not inhibition of hERG1 although all exhibited probability of hepatotoxicity. Our phenotypic screens demonstrated a potent effect of four quinolones (DB2131, DB2186, DB2191 and DB2217) with EC₅₀ < 3 μM, being at least 4-fold more active than Bz *in vitro*. When amastigotes were assayed, eight quinolines were more effective than Bz (2.7 μM), showing EC₅₀ values ranging from 0.6 to 0.1 μM. Due to the high selectivity index especially against intracellular forms, DB2186, DB2191 and DB2192 were moved to *in vivo* assays. Although no major toxic events, DB2192 presented high levels of plasmatic ALT levels suggestive of hepatic damage when acute toxicity studies were performed.

The efficacy *in vivo* analysis showed that only DB2186 that presented higher selectivity (123 and 640) and activity (0.78 and 0.15 μM) upon bloodstream and intracellular forms from the DTUs II and VI, respectively, was able to decrease parasitemia levels providing about 60% of inhibition when 50 mg/kg was given for five consecutive days to mice models of *T.cruzi* infection.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, experimental chemotherapy, quinolines, *in vitro*, *in vivo*, *in silico*.

Running title: Quinolines against *T.cruzi*

Introduction

Chagas disease (CD), belonging to the group of neglected diseases, is endemic in 18 countries in Latin American, constituting a serious and alarming public health problem, essentially presenting a chronic progressive pathology that affects more than 8 million people worldwide (DNDi, 2015). CD is caused by the protozoan digenetic *Trypanosoma cruzi*, and its transmission occur primarily via bug triatomine vectors and may also include other routes as via transfusion, congenital (both in decline due security measures adopted by the endemic countries), due to laboratory accidents and by ingestion of food and drink contaminated with the feces and/or the entire triatomines containing infective forms of the parasite (Chatelain, 2015). The treatment of this zoonosis is based on two nitro-heterocyclic drugs, nifurtimox (Nif) and 2-nitroimidazole benzimidazole (Bz), introduced in the clinical therapy over 4 decades (Chatelain & Konar, 2015). The main limitations to both nitro-derivatives are the long time administration and the frequent side effects, in addition to the occurrence of natural resistant parasite strains and low action on late chronic phase (Soeiro et al., 2013). Other compounds that have also been clinically evaluated showed discrepant results and/or therapeutic failure including allopurinol, azoles such as ketoconazole, itraconazole, and more recently ravuconazole and posaconazole, the later despite their excellent activity *in vitro* and *in vivo* (murine and canine models) were inactive in clinical trials recently performed on chronic patients (Molina et al., 2015). These findings underscore the urgent need to search new trypanocidal

agents with characteristics for a target product profile for CD considering (a) the efficacy towards the relevant forms for human infection and different parasite strain, including those naturally resistant to Bz and Nif and (b) the lower toxicity as compared to the reference drugs since severe side effects are the major cause of treatment discontinuation (DNDi, 2015; Chateleir, 2014). In this context, many compounds have been tested *in vitro* and *in vivo* but up to now few candidates are found (Chatelain & Konar, 2015; Keenan & Chaplin, 2015). Quinolines are a class of organic aromatic heterocyclic potent anti-parasitic compounds with wide analysis in malaria experimental models (Vandekerckhove & D'hooghe, 2015) besides exhibiting potent action against *Trypanosoma brucei* and *T. b. rhodesiense*, with EC₅₀ values ranging from 0.8-34 μM (Hiltensperger et al., 2012). Then, due to their well-known activity against different pathogens, our present goal was to investigate the biological anti-*T. cruzi* activity of nine novel quinolines through phenotypic studies *in vitro* by assessing different forms (trypomastigotes and amastigotes) and parasite strains (DTUs II and VI). We also evaluated the potential toxicity of quinolines derivatives towards different host cell types (as L929 cell lines and primary cultures of cardiac cells), moving those more active against intracellular forms to *in vivo* analysis of acute toxicity and efficacy on mouse experimental models.

Material and Methods

Compounds: The quinolines (DB2104, DB2131, DB2161, DB2171, DB2186, DB2191, DB2192, DB2212 and DB2217) were synthesized by Dr. David W Boykin (Georgia State University, Atlanta, Georgia, and USA) (**Figure 1**). Benznidazole (Bz) (2-nitroimidazole; Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco [LAFEPE], Brazil) was used as reference drug. Stock solutions were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) with the final concentration of the solvent never exceeding 0.6% and 10% in assays *in vitro* and *in vivo*, respectively, which is not toxic to the parasite, mammalian cells and mice, respectively.

Computational assessment of the drug-like properties: Absorption, distribution, metabolism, excretion and toxicity (ADMET) properties of the studied

quinolines were evaluated using the pkCSM approach, which uses graph-based signatures to develop predictive ADMET (Pires et al., 2015.)

Parasites: Bloodstream trypomastigote (BT) forms of the Y strain were obtained from the blood samples of infected albino Swiss mice at the peak of parasitemia. The purified parasites were resuspended in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal bovine serum as reported previously (Meirelles et al., 1986; Batista et al., 2010). Trypomastigotes of Tulahuen strain expressing the *Escherichia coli* β -galactosidase gene (Buckner et al., 1996) were collected from the supernatant of *T.cruzi*-infected L929 cultures as reported (Timm et al., 2014; Romanha et al., 2010).

Cell cultures: For the toxicity assay on mammalian cells, primary cultures of cardiac cells (cc) obtained from mice embryos were plated in 96 well plates previously coated with 0.01% gelatin (Meirelles et al., 1986). L929 cell lineages were obtained as described in Romanha et al., (2010).

Cytotoxicity *in vitro* tests: The cc were incubated for 24 h at 37°C, with different concentrations of each compound (0 to 96 μ M) diluted in RPMI and then, the morphology, cell density and spontaneous contractibility evaluated by light microscopy and their cellular viability determined by the Presto Blue test as reported (Timm et al., 2014). L929 cells were incubated for 24h and 96 h at 37°C, with different concentrations of each compound (0 to 96 μ M) diluted in RPMI and their cellular viability determined by the Alamar Blue test as reported (Timm et al., 2014). The results were expressed by following the manufacturer instructions and the value of LC₅₀ that corresponds to the concentration that reduces in 50% the cellular viability, determined. Selective index (SI) is expressed by ratio between the values obtained for LC₅₀ over the host cells and the EC₅₀ obtained over the parasites.

Trypanocidal activity: Bloodstream trypomastigotes (BT) of the Y strain (DTU II) (Zingales et al., 2009) (5×10^6 per mL) were incubated for 2h and 24 h at 37°C in RPMI in the presence or not of serial dilution of the compounds (up to 32 μ M). After compound incubation, the death parasite rates were determined by light microscopy through the direct quantification of the number of live parasites using a Neubauer

chamber, and the EC₅₀ concentration (the compound concentration that reduces in 50% the number of parasites) calculated (Timm et al., 2014 a). For the assay on intracellular forms, culture-derived trypomastigotes of *T.cruzi* (Tulahuen strain expressing β-galactosidase; DTU VI) were used to infect L929 cultures using a ratio of 10:1 (parasite : host cell). After 2 h, the cultures were washed and cultivated for another 48 h for the establishment of infection. Then, the compounds were added using increasing non-toxic concentrations to the mammalian host cell followed by maintenance at 37°C for 96 h for determination of EC₅₀ values. After addition of 50 μL of the substrate (CPRG - chlorophenol red glycoside) 500 mM) in 0.5% Nonidet P40 and incubation at 37°C for 18 h, the absorbance at 570 nm was measured, and results expressed as percent inhibition of infection rate (Romanha et al., 2010).

Mouse acute toxicity: In order to determine the no-observed-adverse-effect level (NOAEL), increasing doses of the tested compounds (up to 200 mg/kg of body weight) were injected by intraperitoneal (ip) route individually in Swiss female mice (21 to 23 g, n = 2 per assay of the tested compounds). Treated animals were inspected for toxic and sub-toxic symptoms according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) guidelines. Forty-eight hours after compound injection, the NOAEL values were determined as reported (Da Silva et al., 2012). Biochemical analysis performed at 48 h post compound exposure was followed as reported at CECAL platform (Fiocruz/RJ) (Soeiro et al., 2013; Da silva et al., 2012).

Mouse infection and treatment: Swiss Webster male and female mice (18-20 g) obtained from the animal facilities of CECAL were housed at a maximum of 7 per cage and kept in a specific pathogen free (SPF) room at 20–24°C under a 12/12 h light/dark cycle and provided with sterilized water and chow ad libitum. The animals were allowed to acclimate for 7 days before starting the experiments. Infection was performed by intraperitoneal (ip) injection of 10⁴ bloodstream trypomastigotes (Y strain). Age-matched non-infected mice were maintained under identical conditions (Batista et al., 2010). Quinolines were first dissolved in DMSO and then freshly diluted with sterile distilled water. The stock solution of benznidazole (N-benzyl-2-nitroimidazol acetamide) was prepared in sterile distilled water with 3% Tween 80 (Sigma Aldrich). The animals were divided into the following groups (n >3 per group): uninfected (non-infected and non-treated);

untreated (infected but treated only with vehicle); and treated (infected and treated with the compounds). The therapy was performed through five daily doses, starting at the 5 dpi, which corresponds to the parasitemia onset in these experimental animal models, using 12.5-50 mg/kg/day (via ip) and 100 mg/kg/day Bz (po). In all assays, only mice with positive parasitemia were used in the infected groups.

Parasitemia and mortality rates: Parasitemia was individually checked by direct microscopic counting of parasites in 5 μ L of blood, and mortality rates checked daily until 30 days post treatment and expressed as percentage of cumulative mortality (% CM) as described before (Timm et al., 2014).

Ethics: All procedures were carried out in accordance with the guidelines established by the FIOCRUZ Committee of Ethics for the Use of Animals (CEUA LW16/14).

Statistical Analysis: Statistical analysis performed by the ANOVA test with the level of significance set at $p \leq 0.05$.

Results

The phenotypic *in vitro* study using DB2104, DB2131, DB2161, DB2171, DB2186, DB2191, DB2192, DB2212 and DB2217 (**Figure 1**) was carried out to evaluate the activity of these compounds upon BT forms (Y strain – DTU II), and their corresponding toxicity towards mammalian host cell, L929 cultures and cardiac cells (**Table 1**). Our analysis demonstrated that after a short period of incubation (2 h) using increasing concentrations of each quinoline, as also noticed with benznidazole, none quinolone were active (**Table 1**). Following 24 h of incubation, 7 out of the 9 compounds presented higher trypanocidal activity than Bz, exhibiting EC_{50} values $\leq 8 \mu$ M (**Table 1**). Among them, DB2186 was the most effective ($EC_{50} = 0.78 \mu$ M) being 12 -fold more active than the reference drug, reaching EC_{90} value of 17μ M (**Table 1**).

Next, we evaluated the toxicity profile of the studied quinolines using increasing concentrations upon the host cell in order to exclude toxic compounds and concentrations. Cellular viability studies using colorimetric assays as PrestoBlue (cardiac cells) and AlamarBlue (L929 cultures) showed that after 24-96 h of

incubation, none molecules presented detectable toxicity up to 96 μM (**Table 1, 2**). The next screening step consisted on trypanocidal action upon intracellular forms from other parasite DTU (Tulahen strain transfected with β -galactosidase - DTU VI) following Romanha et al., (2010), with minor modifications. Our findings showed that the incubation of infected L929 cells for 96 h at 37 ° C using up to 10.6 μM of each compound, all quinolines displayed better results than Bz, with EC_{50} values ranging from 0.1 μM up to 2.05 μM and selective indexes superior than 71 (**Table 2**). Next, the ADMET (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) properties of quinolines using the pkCSm tool was evaluated. In the first analysis, we found that DB2186, DB2192 and DB2217 did not infringe any of the Lipinski's rule of five that represents a predicative of good oral absorption. The other compounds violated only one rule, due to its LogP above 5 (**Table 3**). The *in silico* ADME analysis of these molecules (**Table 4**) showed good probability of permeability on Caco cells, with values above of the adopted threshold of 0.9 and all compounds with probability higher than 89% of human intestinal absorption with better oral absorption profile than the reference drug (Bz). This series of compounds have positive predicate to be metabolized by CYP3A4. Toxicity predictions (**Table 5**) pointed out that the DB series do not present probability of mutagenicity nor to inhibit hERG1, but all presented probability of inhibiting hERG2. Unfortunately, the quinolines of this series showed high probability of hepatotoxicity, indicating a need for evaluation of hepatic markers in biochemical analysis *in vivo*. Then, based on the excellent data mainly obtained on infected host cell cultures, three compounds that reached the higher SI (DB2186, DB2191 and DB2192) were moved to *in vivo* analysis, using Swiss mouse models. Aiming to exclude toxic doses, preliminary acute toxicity studies were conducted in female Swiss mice. NOAEL values revealed that, up to 200mg/kg via ip, no major toxic aspects could be noticed until 48 h after quinolines exposure (**Table 6**). Although no tested dose induced death or changes in animal behavior/clinical aspects, after 48 hours of treatment a reduction on the animal weight gain was observed with all tested compounds, reaching 50 up to 100% reduction (data not shown). When blood plasmatic biochemical analysis were evaluated DB2192 at 200 mg/kg induced a statistically significant increase in ALT levels ($p<0.05$) suggestive of hepatic alteration (**Table 7**). Next, efficacy studies were conducted using acute mouse models of *T.cruzi* infection using female (**Figure 2**) and male (**Figure 3**) animals inoculated with Y strain and treated (ip) for

5 consecutive days using non-toxic doses (12.5–50 mg/kg/day). Our results demonstrated that 25mg/kg/day DB2186 resulted in 25% of reduction on the parasitemia peak, while DB2191 and DB2192 exhibited similar or superior parasite load in comparison to infected and untreated group (**Figure 2A**). Regarding survival rates, except DB2192 none of the tested compounds was able to protect against the mortality induced by the parasite infection (**Figure 2B**). Another set of experiments conducted using male animals confirmed that DB2186 was the most active compound, reaching at 50mg/kg/day reduction levels of 63% of parasitemia levels while DB2191 and DB2192 resulted in 14 and 31 % of decrease and Bz completely suppressed the parasitemia at the peak (8 dpi - **Figure 3A**). Despite reducing the parasitemia, DB2186 was unable to protect against mortality, exhibiting 100% mortality while untreated group showed about 83% (**Figure 3B**). On the other hand DB2191 showed lower mortality levels, presenting only 25% of death, at similar levels as that found on female models.

Discussion

Chagas disease (CD) therapy, based on two nitro-derived compounds (Benznidazole and Nifurtimox) introduced in the clinic for more than 40 years, has severe limitations including serious side effects, low efficacy on the later infection stage (later chronic phase) besides occurrence of naturally resistant parasite strains (Chatelain, 2014). As up to now no vaccine is commercially available, chemotherapy still represents the unique weapon to control and treat CD and then, novel therapeutic options are urgently needed including the use of combined therapy, repurposing of medicines, as well as developing analogs of existing drugs besides library screening of biomolecules (Soeiro et al., 2013). Quinoline-containing compounds as quinine and chloroquine have a long history as anti-parasitic agents especially against *Plasmodium* parasites (Vandekerckhove & D'Hooghe, 2015; França et al., 2008). The increased resistance against these drugs lead to the renew interest on the synthesis of novel derivatives and many biological studies have demonstrated the promising antimalarial therapeutic arsenal of these quinoline-based compounds, including the strategy of using hybrid molecules containing a quinoline core like the artemisinin-quinoline elements (Vandekerckhove & D'Hooghe, 2015; Biamonte et al. 2013). As recent studies showed the antitrypanosomal properties of quinolines (Pomel et al., 2015;

Hiltensperger et al., 2012), presently our aim was to investigate the biological effect of nine novel quinolines against *T.cruzi* infection *in vitro* and *in vivo*. Our findings confirmed the *in vitro* activity of these compounds towards both trypomastigotes and intracellular forms of the parasite: most molecules presented excellent trypanocidal activity as compared to Bz, being the quinoline DB2186 the most effective exhibiting EC₅₀ and EC₉₀ values of 0.78 ± 0.46 and 17 ± 8µM, respectively on bloodstream trypomastigotes. Also, all tested compounds were very active on intracellular parasites especially DB2191, DB2192 and DB2186 reaching EC₅₀ values ≤ 0.15 µM and high selectivity indexes (>600). The quinolines were active against parasite strains from DTUs II (Y strain) and VI (Tulahuen strain) with stronger efficacy than Bz *in vitro*. Our morphological and colorimetric assays of cellular viability demonstrated the low toxicity behavior of these novel quinolines *in vitro* including low cardiotoxicity profile evaluated directly towards primary cultures of cardiac cells, which are relevant targets for both *T.cruzi* infection and inflammation. Their toxicity profile was further explored using mouse models of acute toxicity since in accordance with laboratory animal welfare policies, before proceeding to *in vivo* efficacy assays at least theoretical analysis of the ADMET properties (absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity) are largely desirable. Presently, these properties regarding the novel quinolines was performed using the pkCSm tool. DB2186 and DB2192 did not infringe any of the Lipinski's rule of five that represents a predicative of good oral absorption while DB2191 violated only one rule, due to its LogP above 5. These quinolines showed good probability of permeability on Caco cells and human intestinal absorption with better oral absorption profile than Bz. These molecules also presented positive predicate to be metabolized by CYP3A4, indicating the need for further studies of interaction with drugs that inhibit this enzyme such as ritonavir and lopinavir. Toxicity predictions did not demonstrate probability of mutagenicity nor inhibition ability of hERG1, but all presented probability of inhibiting hERG2. Unfortunately, the quinolines of this series showed high probability of hepatotoxicity, indicating a need for evaluation of hepatic markers in biochemical analysis *in vivo* that was next conducted with DB2192, DB2191 and DB2186. In fact although no major toxic events were observed when preliminary analysis of acute toxicity was done on mouse models (NOAEL = 200mg/kg), DB2192 presented a statistically significant enhancement of ALT levels indicative of hepatic damage as previously predicted by the *in silico* studies. To access

efficacy *in vivo*, both female and male experimental models of *T.cruzi* infection were used and promising results were found using DB2186 that exhibited a considerable potency *in vitro* against both bloodstream and intracellular forms of *T.cruzi*. The administration of few doses of DB2186 resulted in a considerable reduction of the parasitemia levels (up to 60%) although this quinolone was not able to protect against mortality rates. DB2191 and DB2192, which were highly selective upon intracellular forms *in vitro*, were completely inactive *in vivo*. It is important to consider that DB2186 was the only molecule that exhibited a consistent higher selectivity index (123 and 640) against both parasite forms that are relevant for the human infection, being about 12- and 18-fold more active than Bz, respectively. In fact, recent outcomes from the first clinical trials in Chagas disease evaluating 14 α -demethylase inhibitors from the azole (posaconazole and the E1224 ravuconazole) demonstrated elevated parasitological failure that can be, at least in part, attributed to their inability to target the non-dividing trypomastigote forms although being very potent against intracellular parasites, reaching nanomolar efficacy *in vitro* (Chatelain, 2014). As reported in recent reviews, a common sense would argue that a promising drug candidate for CD should be effective against different *T. cruzi* strains (belong to distinct parasite DTUs) and evolutive forms and in the case of the ergosterol inhibitors, the end product of the CYP51 enzyme might be essential for highly replicating parasites but not for non- to slow-replicating ones, which could partially explain why sustained parasite clearance was not observed with the azoles in those recent clinical trials (Morillo et al., 2015; Chatelein, 2014). One important concern is related to the quinolines solubility that may have impaired a more successful *in vivo* result since the tested compounds were hardly soluble even assaying different vehicles like cyclodextrin and carboxymethylcellulose (data not shown). It is possible that minor structural modifications of these molecules can improve their solubility allowing further animal studies of efficacy for longer periods of therapy and even reducing the drug concentrations. In fact, quinolines have been widely studied and changes in their structures carried out aiming to enhance their activity against different pathogens (Baragaña et al., 2015; Gopinath et al., 2014; Gopinath et al., 2013; Upadhayaya et al., 2013). The present set of results provide a basis for the development of novel quinolone derivatives presenting better solubility and possibly improving the activity of DB2186 in order to be further screened in *in vitro* and *in vivo* studies, and thus contributing for the identification

of more active and safe medicines to treated neglected parasitosis such as Chagas disease.

Acknowledgments

The presente study was supported by grants from Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Oswaldo Cruz, PDTIS, PROEP/CNPq/Fiocruz and CAPES. MNCS is research fellows of CNPq and CNE research. The authors thank the Program for Technological Development in Tools for Health-PDTIS-FIOCRUZ for use of its facilities. This work was also supported, in part, by the National Institutes of Health USA Grant No. AI06420 and by The Bill and Melinda Gates Foundation through a subcontract with the CPDD (to D.W.B.).

References

Baragaña B, Hallyburton I, Lee MC, Norcross NR, Grimaldi R, Otto TD, Proto WR, Blagborough AM, Meister S, Wirjanata G, Ruecker A, Upton LM, Abraham TS, Almeida MJ, Pradhan A, Porzelle A, Martínez MS, Bolscher JM, Woodland A, Norval S, Zuccotto F, Thomas J, Simeons F, Stojanovski L, Osuna-Cabello M, Brock PM, Churcher TS, Sala KA, Zakutansky SE, Jiménez-Díaz MB, Sanz LM, Riley J, Basak R, Campbell M, Avery VM, Sauerwein RW, Dechering KJ, Noviyanti R, Campo B, Frearson JA, Angulo-Barturen , Ferrer-Bazaga S, Gamo FJ, Wyatt PG, Leroy D, Siegl P, Delves MJ, Kyle DE, Wittlin S, Marfurt J, Price RN, Sinden RE, Winzeler EA, Charman SA, Bebrevska L, Gray DW, Campbell S, Fairlamb AH, Willis PA, Rayner JC, Fidock DA, Read KD, Gilbert IH. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature*.18;522(7556):315-20. 2015.

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

Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett.* 15; 23(10):2829-43. 2013.

Buckner FS, Verlinde CLMJ, La Flamme AC, van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing b-galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2592-2597. 1996.

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

Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug Design, Development and Therapy*, 2015; (9): 4807–4823.

Da Silva CF, Batista Dda G, 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 Mde N C. *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(1): e30356. 2012.

Drugs for Neglected Diseases Initiative. 2015 <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas/current-treatment.html>
Accessed 09/29/2015.

França TCC, dos Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: Aspectos Históricos E Quimioterapia. *Quim. Nova*. 31(5), 1271-1278. 2008.

Gopinath VS, Pinjari J, Dere RT, Verma A, Vishwakarma P, Shivahare R, Moger M, Kumar Goud OS, Ramanathan V, Bose P, Rao M V, Gupta S, Puri SK, Launay D, Martin D. *Eur. J. Med. Chem.* 69, 527. 2013.

Gopinath VS, Rao M, Shivahare R, Vishwakarma P, Ghose S, Pradhan A, Hindupur R, Sarma KD, Gupta S, Puri SK, Launay D, Martin D. Design, synthesis,

ADME characterization and antileishmanial evaluation of novel substituted quinoline analogs. *Bioorg Med Chem Lett.* 1;24(9):2046-52. 2014.

Gillingwater K, Kumar A, Ismail MA, Arafa RK, Stephens CE, Boykin DW, Tidwell RR, Brun R. *In vitro* activity and preliminary toxicity of various diamidine compounds against *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol.* 11; 169(3-4):264-72. 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.019. Epub 2010 Jan 25.

Hiltensperger G, Jones NG, Niedermeier S, Stich A, Kaiser M, Jung J, Puhl S, Damme A, Braunschweig H, Meinel L, Engstler M, Holzgrabe U. Synthesis and structure-activity relationships of new quinolone-type molecules against *Trypanosoma brucei*. *J Med Chem.* 22;55(6):2538-48. 2012.

Keenan M, Chaplin JH. A new era for chagas disease drug discovery? *Prog Med Chem.* 54:185-230. 2015.

Meirelles M N, De Araujo-Jorge T C, Miranda CF, De Souza W, Barbosa HS Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *European Journal Cell Biology.* v.41:198-206. 1986.

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

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

Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem.* 14;58(9):4066-72. 2015. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.

Pomel S, Dubar F, Forge D, Loiseau PM, Biot C. New heterocyclic compounds: Synthesis and antitrypanosomal properties. *Bioorg Med Chem.* 15;23(16):5168-74. 2015.

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

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; 1-23.2013.

Timm BL, da Silva PB, Batista MM, da Silva FHG, da Silva CF, Tidwell RR, Patrick DA, Jones SK, Bakunov SA, Bakunova SM, Soeiro MNC. *In vitro* and *In vivo* Biological Effect of Novel Arylimidamide Derivatives Against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* 58(7): 3720-6. 2014

Upadhyaya RS, Dixit SS, Földesi A, Chattopadhyaya J. New antiprotozoal agents: their synthesis and biological evaluations. *Bioorg Med Chem Lett.* 1;23(9):2750-8. 2013.

Vandekerckhove S, D'hooghe M. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. *Bioorg Med Chem.* 15;23(16):5098-119. 2015.

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

Legend of the figures

Figure 1: Chemical structure quinoline.

Figure 2: *In vivo* efficacy studies on female Swiss mice infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes (Y strain). Parasitemia levels (A) and mortality rates (B).

Figure 3: *In vivo* efficacy studies on male Swiss mice infected with 10^4 bloodstream trypomastigotes (Y strain). (A) Parasitemia levels and (B) Mortality rates.

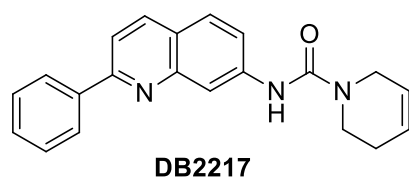
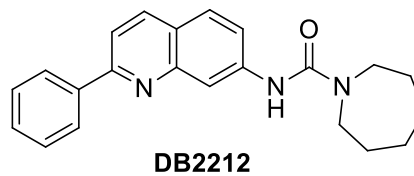
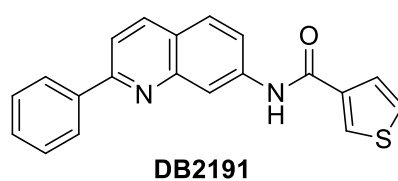
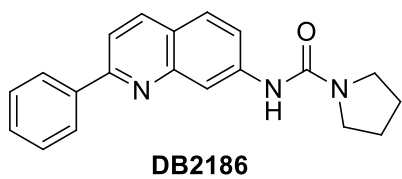
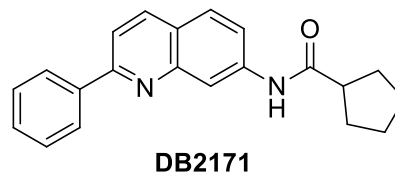
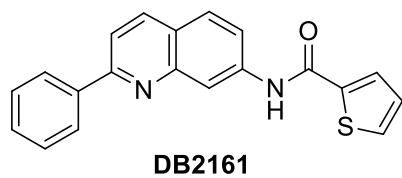
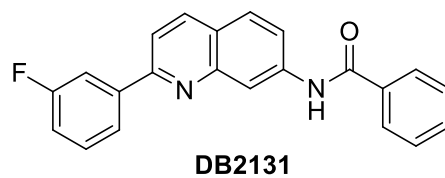
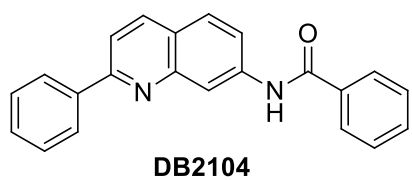


Figure 1: Chemical structure of quinoline nine selected quinolines assayed in this work.

Table 1: *In vitro* activity of the quinolines and benznidazole on bloodstream trypomastigotes of the Y strain: EC₅₀ and EC₉₀ values after 2 and 24 hours, LC₅₀ values on cardiac cells after 24h of incubation at 37 °C and for the corresponding selectivity index.

| Compound | EC ₅₀ (mean ± SD) | | EC ₉₀ (mean ± SD) μM | | LC ₅₀ CC (mean ± SD) μM | |
|---------------|------------------------------|---------------|---------------------------------|----------|------------------------------------|-------|
| | 2 h | 24 h | 2 h | 24 h | LC ₅₀ | SI*24 |
| Bz | >32 | 9.6 ± 1.4 | >32 | 31 ± 0.6 | >1000 | >104 |
| DB2104 | >32 | 6.1 ± 2.8** | >32 | >32 | >96 | >16 |
| DB2131 | >32 | 2.5 ± 1.1** | >32 | >32 | >96 | >38 |
| DB2161 | >32 | 8 ± 2.9 | >32 | >32 | >96 | >12 |
| DB2171 | >32 | 15 ± 8 | >32 | >32 | >96 | >6 |
| DB2186 | >32 | 0.78 ± 0.46** | >32 | 17 ± 8 | >96 | >123 |
| DB2191 | >32 | 2.6 ± 0.64** | >32 | 16 ± 15 | >96 | >37 |
| DB2192 | >32 | 24 ± 5.8 | >32 | >32 | >96 | >4 |
| DB2212 | >32 | 7.2 ± 3.2 | >32 | >32 | >96 | >13 |
| DB2217 | >32 | 2.7 ± 1.2** | >32 | 19 ± 12 | >96 | >36 |

*based on the EC₅₀ 24h

**Anova statistical analysis of studied compound and Bz: ($p < 0.05$)

Table 2: Activity (EC₅₀) and selectivity index (SI) quinolines and benznidazole on L929 cell lines infected with *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain transfected with β-galactosidase) after 96 hours of infection.

| Compounds | EC ₅₀ (mean ± SD) | LC ₅₀ 96h | SI |
|---------------|------------------------------|----------------------|------|
| Bz | 2.7 ±1 | >1000 | >36 |
| DB2104 | 0.54 ± 0.2 | >96 | >178 |
| DB2131 | 0.6±0.3 | >96 | >160 |
| DB2161 | 0.5±0.038** | >96 | >192 |
| DB2171 | 2.05±0.6 | >96 | >71 |
| DB2186 | 0.15±0.01** | >96 | >640 |
| DB2191 | 0.1±0.0** | >96 | >960 |
| DB2192 | 0.1±0.001** | >96 | >960 |
| DB2212 | 0.3±0.039** | >96 | >320 |
| DB2217 | 0.41±0.27** | >96 | >234 |

*based on the EC₅₀

**Anova statistical analysis of studied compound and Bz: ($p < 0.05$)

Table 3: Acute toxicity analysis: Escalating dose assays using a single mice per dose.

| Compound | 20 mg/kg | 50 mg/kg | 100 mg/kg | 200 mg/kg | NOAEL |
|-----------------|-----------------|-----------------|------------------|------------------|--------------|
| DB2186 | NDE | NDE | NDE | NDE | 200 mg/kg |
| DB2191 | NDE | NDE | NDE | NDE | 200 mg/kg |
| DB2192 | NDE | NDE | NDE | NDE | 200 mg/kg |

NDE: No detectable effect.

NOAEL: (No observed adverse effect level): For non-invasive parameters.

*Effects observed after 2 hours up to 48 hours of compound administration.

Table 4: Plasma biochemical analysis of female mice after 48 h of compound administration.

| | Compound | Mean ± SD |
|------------|-----------------|------------------|
| ALT | Vehicle | 278 ± 26 |
| | DB2186 | 200 ± 0* |
| | DB2191 | 236 ± 16 |
| | DB2192 | 481 ± 96 |
| BUN | Vehicle | 54 ± 4 |
| | DB2186 | 44 ± 2 |
| | DB2191 | 31 ± 0.6** |
| | DB2192 | 27 ± 25 |
| CK | Vehicle | 112 ± 27 |
| | DB2186 | 68 ± 42 |
| | DB2191 | 236 ± 16 |
| | DB2192 | 333 ± 11** |
| AST | Vehicle | 352 ± 29 |
| | DB2186 | 188 ± 0* |
| | DB2191 | 278 ± 90 |
| | DB2192 | 621 ± 142 |

**Anova statistical analysis of studied compound and vehicle: ($p < 0.05$)

*One assay.

Reference values:

ALT: 28,00 a 132,00 U/L

BUN: 18,00 a 29,00 mg/dL

CK: 18,00 a 29,00 U/L

AST: 59,00 a 247,00 U/L

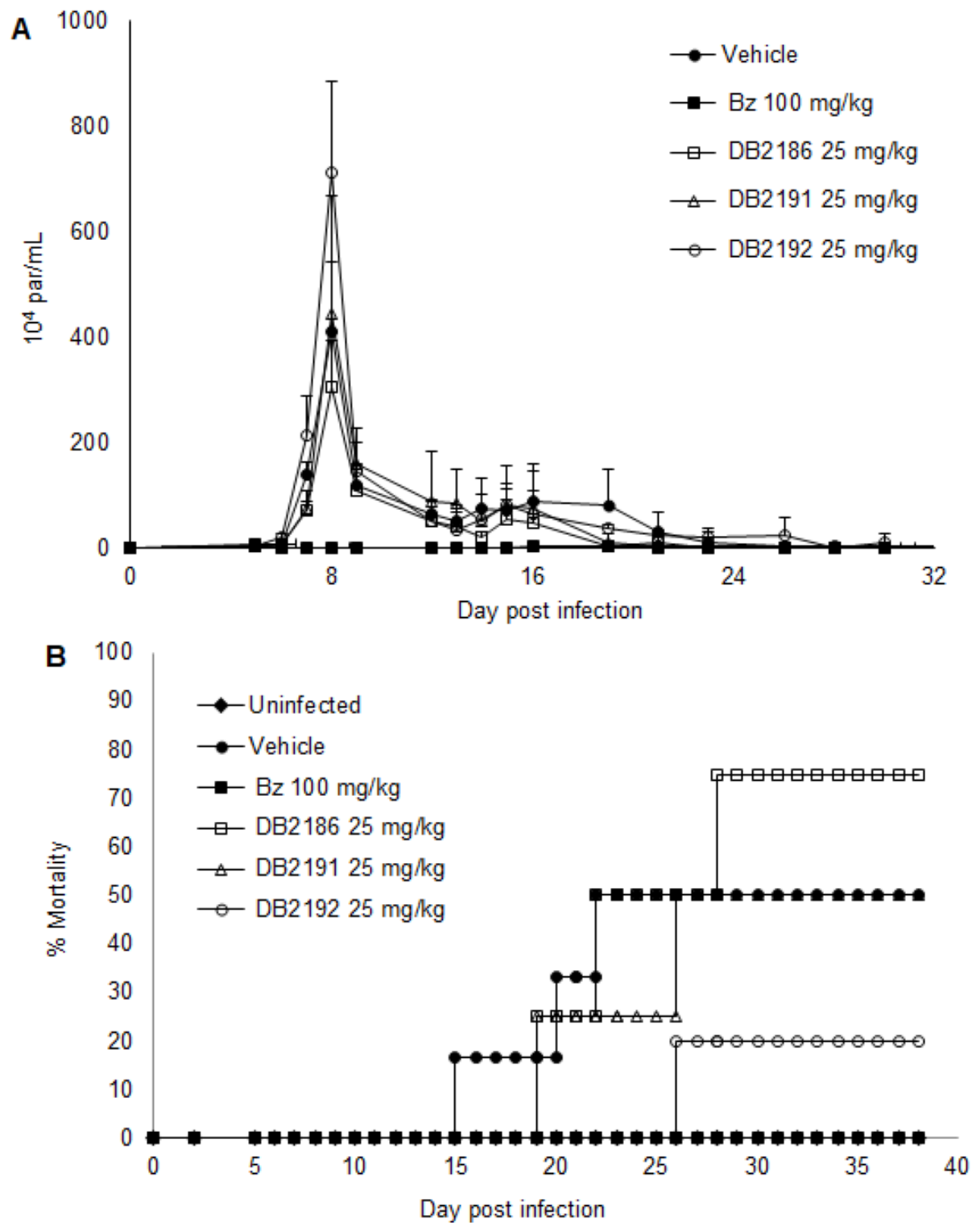


Figure 2: *In vivo* efficacy studies on female Swiss mice infected bloodstream trypomastigotes (Y strain), (A) parasitemia and (B) mortality.

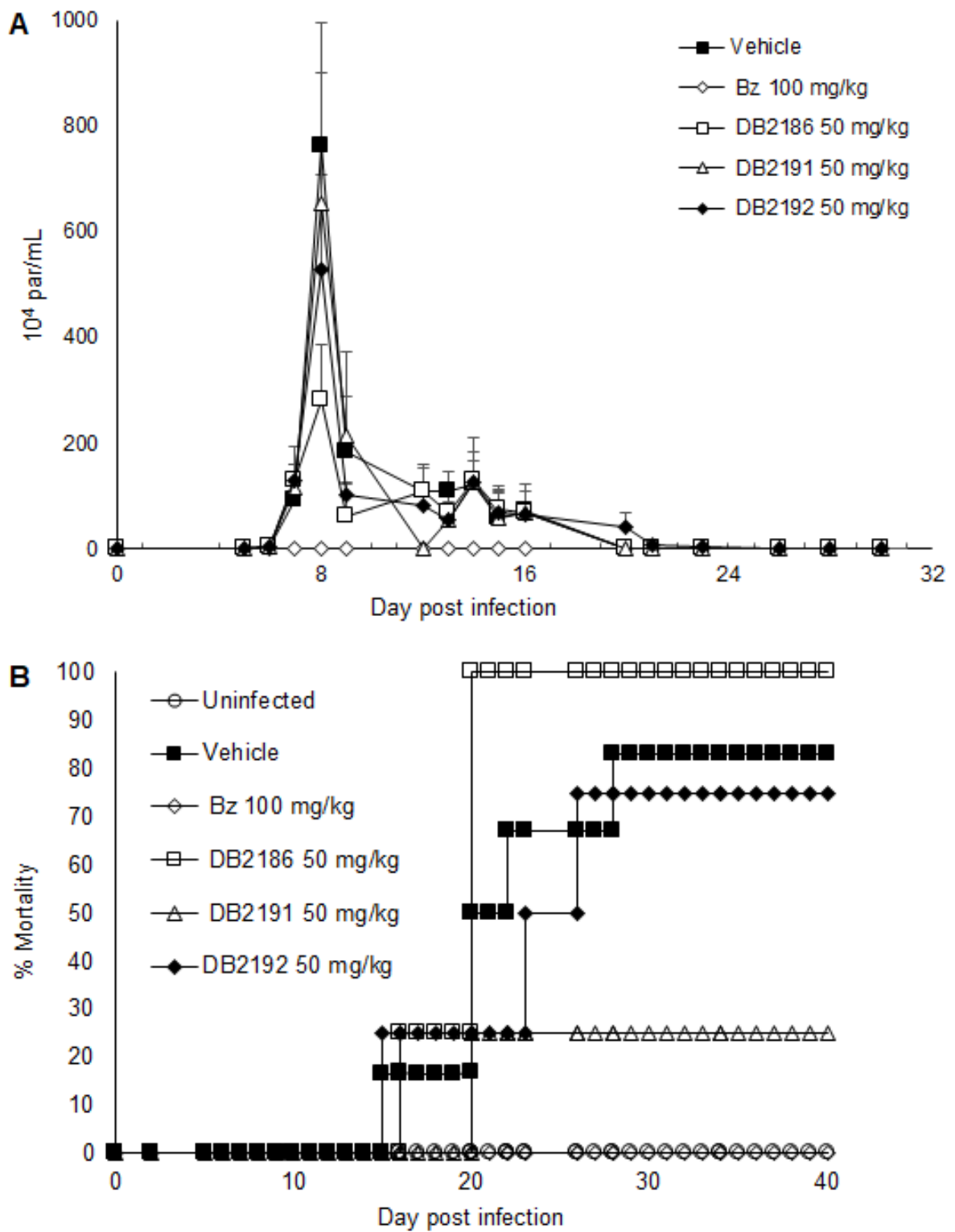


Figure 3: *In vivo* efficacy studies on male Swiss mice infected with 10⁴ bloodstream trypomastigotes (Y strain), (A) parasitemia and (B) mortality.

5. Discussão

Nos últimos 40 anos, o único tratamento disponível para a doença de Chagas (DC) permanece vinculado a dois agentes nitroheterocíclicos, o Benznidazol e o Nifurtimox (BZ e Nif, respectivamente). Ambos possuem severas limitações como graves efeitos colaterais, baixa eficácia durante a fase crônica tardia da doença, além de ocorrência de cepas do parasito naturalmente resistentes (Chatelain, 2015; Don & Ioset, 2013; Willkinson & Kelly, 2009). Até o momento, nenhuma vacina está comercialmente disponível, logo, a quimioterapia ainda representa a única arma para controlar e tratar esta zoonose negligenciada. Os recentes resultados de ensaios clínicos em portadores chagásicos crônicos, demonstrando a ineficácia do Bz em proteger contra a progressão de lesões cardíacas (ensaio BENEFIT – “Avaliação do benznidazole para interrupção de tripanossomíase”, (Morillo et al., 2015) somadas ao insucesso dos agentes azólicos, que foram avaliados na Espanha e na Bolívia (Molina et al., 2015) destacam a necessidade urgente de se encontrar novos compostos mais eficazes (sobretudo para fase crônica tardia) e seguros. Neste cenário, várias abordagens que vêm sendo utilizadas com sucesso para outras patologias e que estão também direcionadas para a identificação de novos medicamentos para DC incluem a terapia combinada, o reposicionamento de medicamentos já utilizados e licenciados para outras patologias, síntese e identificação de inibidores de moléculas e vias metabólicas específicas, bem como triagem de novos agentes (naturais e sintéticos) a partir de bibliotecas de compostos (Bilbe, 2015; Soeiro et al., 2013). Entre eles alguns que como acima mencionado chegaram as etapas de ensaios clínicos para DC incluem o alopurinol e azoles, tais como o cetoconazol, itraconazol, posaconazole (Pos) e ravuconazole (Rav), todos com resultados insatisfatórios e/ou discrepantes (Molina et al., (2015). Os inibidores anti-fúngicos azólicos Pos e Rav que atuam sobre a enzima 14 α -demetilase (CYP51), apesar dos dados muito promissores (Urbina et al, 1998; Keenan & Chaplin, 2014) *in vitro* e *in vivo* (modelos caninos e murino) (Diniz, et al., 2010), infelizmente apresentaram altos níveis de fracassos terapêuticos durante os ensaios clínicos realizados pela Iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas (DNDi) (Molina et al, 2015). De fato, durante o curso do desenvolvimento de medicamentos para a doença de Chagas, como para outras patologias, nem sempre há uma relação direta entre análises *in vitro* e *in vivo*, e entre os

resultados pré-clínicos e clínicos (Chatelain & Konar, 2015). Em relação a quimioterapia experimental da doença de Chagas uma parte das dificuldades tem sido relacionada com a ausência de marcadores precisos de cura estéril, particularmente durante a fase crônica da infecção, quando a carga parasitária é baixa, a distribuição nos órgãos não é totalmente conhecida, e a negatização da sorologia pode levar anos ou décadas (Francisco et al., 2015; Chatelein & Konar, 2015).

Estudos recentes demonstram que a análise por sistemas de imagem (ex. Bioluminescência) representa uma abordagem sensível para avaliação de eficácia de drogas em modelos murinos experimentais para doença de Chagas, gerando dados não invasivos e com maior precisão que outros métodos, incluindo abordagens moleculares baseadas em PCR (Francisco et al., 2015). Nestes estudos os camundongos inoculados com *T. cruzi* geneticamente modificados (bioluminescentes) são avaliados *in vivo* e *ex vivo* após imunossupressão induzida por ciclofosfamida. Os autores relataram que o Pos foi significativamente menos potente que Bz tanto para infecção experimental aguda quanto a crônica (Francisco et al., 2015). Infelizmente, devido ao alto custo da análise de imagem, somente alguns grupos são capazes de usar essa recente abordagem metodológica. Além disso, os dados do BENEFIT que foi desenvolvido para avaliar a eficácia e segurança de Bz em comparação com o placebo, também não conseguiu demonstrar a proteção deste fármaco em resultados clínicos de portadores crônicos, destacando a necessidade urgente de pesquisas para identificar agentes anti-*T. cruzi* mais eficazes e/ou novas drogas ou combinações de drogas (Morillo et al., 2015).

Neste contexto, o nosso grupo tem estudado a atividade *in vitro* e *in vivo* de diferentes classes de agentes naturais e sintéticos. Uma delas é a classe de compostos amidínicos aromáticos, e grande parte dos dados revelou uma ação muito promissora destas moléculas contra patógenos intracelulares, incluindo o *T. cruzi* (Soeiro et al., 2013). Estes estudos demonstraram que entre este grupo, as arilimidamidas (AIAS) são as que apresentam maior atividade sobre as diferentes formas parasitárias (triposmastigota e amastigota) e sobre diferentes DTUs de *T. cruzi*, incluindo aqueles naturalmente resistentes ao Bz e Nif (Pacheco et al., 2009; Batista et al., 2010; De Souza et al., 2011; Da Silva et al., 2012; De Araújo et al., 2014)

Assim, no primeiro bloco de resultados da presente dissertação, nove amidinas foram testadas *in vitro* e sete foram mais ativas do que Bz contra as formas tripomastigotas sanguíneas, incluindo quatro mono - amidinas DB2228, DB2229, DB2292, DB2294, dois bis-amidinas DB2232, DB2235 e uma bis-AIA DB2255. Outra característica importante de quatro destes compostos (DB2228, DB2229, DB2235, DB2292 DB2294) rápida ação tripanocida após 2 horas de exposição, enquanto Bz era completamente inativo. Quando estes compostos aromáticos foram avaliados sobre amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, pertencentes a outro DTU (cepa Tulahuen - DTU VI) somente a bis-AIA DB2255 exibiu eficácia comparável ao fármaco de referência. Apresentar atividade contra diferentes DTUs do parasito é outra característica desejável para um composto *hit* para doença de Chagas (Chatelain 2015).

Os estudos fenotípicos revelaram que a maioria das amidinas aromáticas testadas não alcançou os critérios de ação biológica sugeridos para molécula líder para DC (**Tabelas 2-3**), sendo somente a bis-AIA DB2255 capaz de obedecer parcialmente os critérios exigidos, entre eles o de eficácia *in vitro* sobre cepas de diferentes DTUs (II e VI). Infelizmente, mesmo apresentando baixos valores de EC₅₀ e EC₉₀ sobre a forma BT a DB2255 não prosseguiu nos testes *in vivo*, devido ao seu baixo índice de seletividade sobre o parasito (em especial sobre formas intracelulares) como preconizado na literatura (Chatelain, 2015).

Experimentos realizados com AIAs, como a DB1831 demonstraram excelente eficácia contra *T. cruzi in vitro*, atuando em faixa nanomolar sobre tripomastigotas sanguíneos (EC₅₀ = 20 nM) após 24 h de incubação, alcançando valores de EC₅₀ = 5nM sobre amastigotas intracelulares (Da Silva et al., 2012). O sal mesilato desta AIA (DB1965), sintetizado buscando maior solubilidade, mostrou uma potente atividade *in vivo* contra modelos experimentais de infecção aguda, com atividade semelhante ao Bz. Em outros ensaios realizados com outra molécula, AIA DB766, foi confirmada a capacidade deste bis-AIA para suprimir a carga parasitária do sangue e do coração de (semelhante ao Bz), além de ser também eficaz contra cepas naturalmente resistentes aos nitroderivados (Batista et al., 2010).

Esses dados corroboram estudos anteriores que demonstraram o promissor efeito fenotípico anti- *T. cruzi* de bis-AIAs (Tim et al., 2014, De Araújo et al., 2014). Embora DB2255 tenha exibido valores de EC₅₀ e EC₉₀ (3,6 e 6.5 µM, respectivamente) menores do que Bz (9,6 e 30,9 µM), ela é menos ativa que outras

AÍAs como a DB766 ($EC_{50}=100nM$) (Batista et al., 2010). Este resultado demonstra claramente que para alcançar alta atividade anti-*T. cruzi* é necessário utilizar a estrutura (“scaffold”) da DB766. Adicionalmente, visando explorar o perfil de segurança pré-clínico, avaliamos através de estudos *in silico* (programa pkCSM), aspectos de ADMET das moléculas amidínicas. Os resultados de cálculos usando a abordagem pkCSM para a estimativa de ADMET e outras propriedades medicamentosas são importantes achados num estágio inicial no processo de descoberta de drogas (Pires et al., 2015). A estimativa *in silico* de propriedades ADMET (**Tabelas 6-7**) mostra que dos quatro compostos mais ativos só DB2229 é permeável a células Caco2. Porém todos os quatro exibiram alta probabilidade de absorção (acima de 90%) pelas células do intestino humano, além de todos os quatro apresentarem razoável volume de distribuição. A predição de toxicidade mostra que nenhum dos quatro apresenta potencial de mutagenicidade, não sendo inibidores de hERGI, considerando todo o esperado para inibir hERGII e ser hepatotóxico (como é Bz). Antes de realizar estudos *in vivo* com estas classes de compostos, é evidente que outras modificações destes análogos são necessárias com o objetivo de melhorar a potência e reduzir a toxicidade.

Dando continuidade aos estudos, a outra classe de compostos avaliada foi a de agentes quinolínicos. Este grupo de compostos derivados de quinolina (ex. quinina e cloroquina) tem uma longa história como agentes antiparasitários, especialmente contra *Plasmodium spp* (Vandekerckhove & D'Hooghe, 2015; França et al., 2008). Devido ao aumento da resistência de algumas cepas de *Plasmodium* aos agentes quinolínicos foi renovado o interesse na síntese de novos derivados, e diversos estudos biológicos têm demonstrado o arsenal terapêutico antimalárico promissor destes compostos à base de quinolina, incluindo a estratégia de utilização de moléculas híbridas que contêm um núcleo de quinilínico associado a outros elementos como a artemisinina (Vandekerckhove & D'Hooghe, 2015). Estudos recentes demonstraram as propriedades tripanocidas de quinolinas (Hiltensperger et al., 2012; Pomel et al., 2015), o que motivou nossa investigação do efeito biológico de nove novas quinolinas contra a infecção por *T. cruzi in vitro* e *in vivo*. Os nossos resultados revelaram a atividade *in vitro* destes compostos sobre ambas as formas parasitárias do protozoário: tripomastigotas e amastigotas intracelulares. A maioria das moléculas avaliadas apresentou excelente atividade tripanocida. Em

comparação com Bz, sendo a quinolina DB2186 a mais eficaz, com valores de EC₅₀ e EC₉₀ de 0,78 ± 0,46 e 17 ± 8 µM, respectivamente, sobre tripomastigotas. Além disso, todos os compostos testados foram muito ativos contra os parasitas intracelulares, especialmente as DB2191, DB2192 e DB2186 atingindo valores de EC₅₀ ≤ 0,15 µM e altos índices seletividade (> 600).

Com base nos elevados índices de seletividade sobre a forma intracelular da cepa Tulahuen, estas três moléculas foram selecionadas para outra etapa de testes, as análises *in vivo*. Como observado no estudo *in vitro* (sobre células de mamífero) não foram observados importantes eventos tóxicos nos ensaios preliminares de toxicidade aguda em modelo animal. No entanto, embora a DB2191 e DB2192 tenham sido as mais seletivas sobre amastigotas, em comparação com a DB2186, a última demonstrou ser uma melhor candidata nos ensaios de eficácia em modelos experimentais de infecção aguda pelo *T. cruzi*. Apesar da possível interferência de características farmacológicas entre estes derivados (tais como propriedades de DMPK como a penetração da droga nos tecidos além seu mecanismo de ação) e que pode ter contribuído para os diferentes resultados *in vivo*, é importante considerar que DB2186 foi a única molécula que exibiu um maior e consistente índice de seletividade (123 e 640) contra ambas as formas do parasita relevantes para a infecção humana: tripomastigota sanguíneo e amastigota, respectivamente sendo cerca de 12 e 18 vezes mais ativa que o medicamento de referência para o tratamento da CD.

De fato, como discutido anteriormente os recentes resultados dos ensaios clínicos da doença de Chagas avaliando inibidores da síntese de ergosterol (posaconazol e o ravuconazol E1224) revelaram elevados índices de falha na cura parasitológica o que pode ser, pelo menos em parte, atribuída à sua limitada ação sobre as formas tripomastigotas, que não são multiplicativas, apesar de serem muito potentes contra os parasitas intracelulares, altamente replicativos, contra os quais atingem eficiência *in vitro* na faixa nanomolar (Keenan & Chaplin, 2015; Chatelain, 2015). Conforme relatado em revisões temáticas recentes, um promissor candidato para a terapia da CD deve idealmente ser eficaz contra diferentes cepas de *T. cruzi* (distintos DTUs) e formas parasitárias. No caso dos inibidores de ergosterol como o Pos, a inibição da CYP51 possivelmente impacta mais rapidamente e de modo mais importante sobre a viabilidade das formas altamente proliferativas (em relação as não-proliferativas, mas altamente infectivas) por requerer maior uso de lipídeos para realização das etapas de seu

ciclo de proliferação celular (Morillo et al., 2015; Chatelain, 2015). As quinolinas presentemente estudadas foram ativas sobre as diferentes DTUs II (cepa Y) e VI (cepa Tulahuen), exibindo superior eficácia que o Bz *in vitro*, corroborando recentes dados da literatura sobre a excelente atividade de derivados quinolínicos contra amastigotas da cepa Tulahuen ($EC_{50} < 1 \mu M$) (Creton et al., 2014). Nossos ensaios morfológicos e colorimétricos de viabilidade celular *in vitro* confirmaram a baixa toxicidade destes novos agentes quinolínicos, incluindo o baixo perfil de cardiotoxicidade avaliado diretamente sobre culturas primárias de células cardíacas que são alvos relevantes durante a infecção e inflamação induzidas pelo *T. cruzi*. A baixa toxicidade *in vitro* foi confirmada utilizando modelos de toxicidade aguda em camundongos que exibiram um NOAEL = 200 mg / kg, exibindo somente pequenas alterações bioquímicas nos níveis plasmáticos de CK e uréia para DB2192 e DB2191, respectivamente. Para avaliar a eficácia *in vivo*, foram utilizados dois modelos experimentais de infecção por *T. cruzi*: camundongos fêmeas e machos infectados com cepa Y do parasito. Os resultados foram muito promissores principalmente após a administração de 5 doses na concentração de 50 mg/kg/dia da DB2186, que reduziu a parasitemia em cerca de 60%. No entanto, é importante destacar uma preocupação relacionada a solubilidade destas quinolinas que poderiam ter sido mais ativas durante os ensaios *in vivo*, dado que os compostos testados apresentaram limitada solubilidade, mesmo avaliando diferentes veículos como ciclodextrina e carboximetilcelulose (dados não mostrados). É possível que pequenas alterações estruturais destas moléculas possam melhorar a sua solubilidade, assim permitindo novos estudos de eficácia em modelos animais por longos períodos de terapia e ainda reduzindo as concentrações do composto. De fato, quinolinas têm sido amplamente estudadas e mudanças em suas estruturas têm sido realizadas com o objetivo de potencializar a sua atividade contra diferentes patógenos (Gopinath et al., 2013; Upadhayaya et al., 2013; Gopinath et al., 2014; Baragaña et al., 2015). Diversas revisões apontam alguns dos parâmetros necessários para que compostos saiam do estágio inicial de testes e sigam para as etapas seguintes, tornando-se candidatos líderes (Don & Ioset et al., 2013), como demonstrado nas **tabelas 2 e 3**.

Assim, algumas moléculas da classe das quinolinas, obedeceram a alguns dos critérios preconizados quanto a ação fenotípica e seletividade (incluindo ação sobre diferentes formas parasitárias e cepa de diferentes DTUs (II e VI)) tendo

sido assim, direcionadas para experimentação animal. Porém demonstraram problemas em relação a solubilização mas mesmo assim, a DB2186 foi capaz de suprimir a parasitemia no oitavo dia (correspondente ao pico da parasitemia neste modelo experimental) em cerca de 60%.

Portanto, o conjunto de resultados no presente estudo fornece uma base para o desenvolvimento de novas amidinas aromáticas e também derivados de quinolinas, e que possam ser futuramente explorados quanto ao potencial antiparasitário e, assim, contribuir para a identificação de compostos mais eficazes e seguros para o tratamento de parasitoses negligenciadas, como a doença de Chagas.

Tabela 2: Critérios de novos candidatos (*Hit compound*) para Doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset, 2013).

| Hit | |
|------------------------------------|--|
| Critério | Parâmetro |
| Eficácia <i>in vitro</i> | Atividade Seletividade: Regras de Lipinski EC ₅₀ ≤10µM sobre amastigotas intracelulares Seletividade: Regras de Lipinski (DTU II e VI). |
| DPMK <i>in silico</i> | Alertas estruturais (metabolismo/reactividade/estabilidade) Priorizar hits, mas não deve ser utilizado como critério de seleção definitivo. |
| Toxicidade <i>in silico</i> | Alertas estruturais Proceder com cautela, testar o mais cedo possível para determinar a extensão do problema percebido. |
| Perfil químico | Rotas sintéticas favoráveis Via sintética aceitável para o composto e/ou análogos (<8 passos) |

Tabela 3: Critérios estágio Lead para Doença de Chagas (adaptada de Don & Ioset, 2013).

| Lead | | |
|-----------------------------------|---|--|
| Critério | Parâmetro | |
| Eficácia <i>in vitro</i> | Atividade | EC ₅₀ 10-20 vezes maior atividade que o Hit. |
| | Seletividade | Maior que o Hit (ideal: ≥50 vezes) vs células de mamíferos. |
| Eficácia <i>in vivo</i> | | Redução de 80% da parasitemia ou não detecção de parasitos ao final do tratamento e aumento da sobrevivência (10x50 mg kg ⁻¹ p.o.) |
| DPMK <i>in silico</i> | Regras de Lipinski | Priorizar hits não devendo ser utilizado como critério de seleção definitivo. |
| DPMK <i>in vitro</i> | Estabilidade metabólica (microsomas do fígado de murinos e humano). | Estabilidade- ranking do progresso dos compostos "médio" ou "alto". |
| | Permeabilidade a células Caco2 ou MDCK Pgp | Ranking do progresso dos compostos "médio" ou "alto" |
| | Solubilidade | Valor de pH abaixo 7.4 > 0.01 mg mL ⁻¹ |
| | Ligação a proteína | Só se medido problema com biodisponibilidade |
| | Inibição de CYP3A4 | EC ₅₀ > 10 μM |
| | Estabilidade no sangue e plasma | Avaliado |
| DPMK <i>in vivo</i> | PK em camundongo | Exposição do camundongo 10 mg kg ⁻¹ bid ou 20 mg kg dos compostos que atingirem níveis plasmáticos acima do EC ₅₀ nas últimas 24 horas progredirem no <i>in vivo</i> . |
| Toxicidade <i>in vitro</i> | Estruturas alerta | Ensaio relevantes (Ames, genotoxicidade, cardiotoxicidade) |
| Toxicidade <i>in vivo</i> | | Não é tóxica em camundongo a dose única |
| Perfil químico | Rotas sintéticas favoráveis | Não há potenciais passivos que impeçam a síntese em escala até 1g + |
| | Relação estrutura-atividade (SAR) | SAR preliminar com o mínimo de 10 compostos: evitar série faltando SAR ou exibindo SAR 'flat'. |

6. Conclusões

- De nove amidinas aromáticas avaliadas, sete apresentaram superior atividade contra as formas tripomastigotas (cepa *y*) em relação ao Bz corroborando os dados anteriores relativos a essa classe de compostos;
- Somente uma amidina, a DB2255 demonstrou perfil tripanocida sobre a forma intracelular de modo semelhante ao Bz, porém em virtude de seu baixo índice de seletividade (21), não foi encaminhada para as análises sobre modelos de infecção experimental *in vivo*;
- Do total de nove novas quinolinas testadas, sete apresentam superior atividade sobre as formas tripomastigotas e todas mais ativas sobre amastigotas (cepa Tulahuen) em relação ao Bz, exibindo valores de 2 a 0,1 μM . Os excelentes índices de seletividade (em especial sobre amastigotas) justificaram a posterior análise *in vivo*.
- As quinolinas DB2186, DB2191 e DB2192 não apresentaram efeitos tóxicos nos modelos de toxicidade aguda (murino) corroborando a baixa toxicidade observada nos estudos *in vitro*.
- Nos estudos sobre modelos experimentais, apesar da baixa solubilidade dos compostos quinolínicos, a DB2186 foi capaz de reduzir a parasitemia de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, alcançando níveis de redução na ordem de 60%.
- O conjunto de dados obtidos nos permite confirmar e concluir que ambas as classes de moléculas estudadas são promissoras candidatas para futuras investigações de novos agentes para o tratamento da DC, porém necessitando de modificações em suas estruturas visando potencializar sua atividade e seletividade, conferindo ainda melhor solubilidade para continuidades dos ensaios *in vitro* e *in vivo* em modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* visando contribuir para conhecimento e identificação de novos fármacos para tratamento dos milhões de portadores chagásicos.

7. Referências Bibliográficas

Albajar-Viñas P, Dias JC. Advancing the treatment for Chagas' disease. *N Engl J Med* 2014,15;370(20):1942-3. doi: 10.1056/NEJMe1403689.

Bano S, Javed K, Ahmad S, Rathish IG, Singh S, Chaitanya M, Arunasree KM, Alam MS. Synthesis of some novel chalcones, flavanones and flavones and evaluation of their anti-inflammatory activity. *Eur J Med Chem* 2013, 65:51-9.

Baragaña B, Hallyburton I, Lee MC, Norcross NR, Grimaldi R, Otto TD, Proto WR, Blagborough AM, Meister S, Wirjanata G, Ruecker A, Upton LM, Abraham TS, Almeida MJ, Pradhan A, Porzelle A, Martínez MS, Bolscher JM, Woodland A, Norval S, Zuccotto F, Thomas J, Simeons F, Stojanovski L, Osuna-Cabello M, Brock PM, Churcher TS, Sala KA, Zakutansky SE, Jiménez-Díaz MB, Sanz LM, Riley J, Basak R, Campbell M, Avery VM, Sauerwein RW, Dechering KJ, Noviyanti R, Campo B, Frearson JA, Angulo-Barturen , Ferrer-Bazaga S, Gamo FJ, Wyatt PG, Leroy D, Siegl P, Delves MJ, Kyle DE, Wittlin S, Marfurt J, Price RN, Sinden RE, Winzeler EA, Charman SA, Bebrevska L, Gray DW, Campbell S, Fairlamb AH, Willis PA, Rayner JC, Fidock DA, Read KD, Gilbert IH. A novel multiple-stage antimalarial agent that inhibits protein synthesis. *Nature* 2015,18;522(7556):315-20.

Basak A, Abouelhassan Y, Huigens Iii RW. Halogenated quinolines discovered through reductive amination with potent eradication activities against MRSA, MRSE and VRE biofilms. *Org Biomol Chem* 2015, (41):10290-4.

Basselin M, Denise H, Coombs GH, Barrett MP. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. *Antimicrob Agents Chemother* 2002, 46 (12):3731-8.

- Basso LG, Rodrigues RZ, Naal RM, Costa-Filho AJ. Effects of the antimalarial drug primaquine on the dynamic structure of lipid model membranes. *Biochim Biophys Acta* 2011,1808(1):55-64.
- Batista DG, Pacheco MG, Kumar A, Branowska D, Ismail MA, Hu L, Boykin DW, Soeiro MN. Biological, ultrastructural effect and subcellular localization of aromatic diamidines in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology* 2010, 137(2):251-9.
- Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* 2015, 373(19):1882.
- Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med* 2015, 373(5):456-66.
- Bern C. Antitrypanosomal therapy for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 2011, 364: 2527-34.
- Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis* 2009, 49 (5):e52-4.
- Biamonte MA, Wanner J, Le Roch KG. Recent advances in malaria drug discovery. *Bioorg Med Chem Lett* 2013 23(10):2829-43.
- Bilbe, Graeme. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. *Science* 2015, 348 (6238):974-6.
- Buckner FS, Verlinde CLMJ, La Flamme AC, van Voorhis WC. Efficient technique for screening drugs activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing b-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother* 1996, 40: 2592-2597.

- Chagas, CJ. Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz 1909, 1, 159-218.
- Chateleïn, E. Chagas Disease Drug Discovery Toward a New Era. Journal of Biomolecular Screening 2015, 20(1):22-35. doi: 10.1177/1087057114550585..
- Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. Drug Des Devel Ther 2015, 19;9:4807-23.
- Chung PY, Bian ZX, Pun HY, Chan D, Chan AS, Chui CH, Tang JC, Lam KH. Recent advances in research of natural and synthetic bioactive quinolines. Future Med Chem 2015, 7(7):947-67.
- 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, Junqueira AC. Ecological diversity of *Trypanosoma cruzi* transmission in the Amazon basin. The main scenarios in the Brazilian Amazon. Acta Trop 2015,151:51-7.
- Coura JR, Junqueira AC. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region - Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz 2015, 110(7):825-30.
- Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. Mem Inst Oswaldo Cruz 2009, 104 (4):549-54.

Coura JR, De Castro, SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. Mem Inst Oswaldo Cruz 2002, 97 (1), 3-24.

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 Chemoth 2011, 55, 4765-4773.

Daliry A, Da Silva PB, Da Silva CF, Batista MM, De Castro SL, Tidwell RR, Soeiro Mde N. *In vitro* analyses of the effect of aromatic diamidines upon *Trypanosoma cruzi*. J Antimicrob Chemother 2009, 64(4):747-50.

Da Silva CF, Batista D da G, 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, SoeiroMde N. *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):e 30356.

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

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

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.

De Souza, E.M., da Silva, P.B., Nefertiti, A.S.G., Ismail, M.A., Arafa, R.K., Tao, B., Nixon-Smith, C.K., Boykin, D.W., Soeiro, M.N.C. Trypanocidal activity and selectivity *in vitro* of aromatic amidine compounds upon bloodstream and intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitology* 2011, 127(2):429-35.

De Souza EM, Oliveira GM, Boykin DW, Kumar A, Hu Q, Soeiro MNC. Trypanocidal activity of the phenyl-substituted analogue of furamidine DB569 against *Trypanosoma cruzi* infection *in vivo*. *J Antimicrob Chemother* 2006, 58(3).

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

De Souza, W. Chagas' disease: facts and reality. *Microbes Infect* 2007, v. 9 (4). 544-5.

Díaz MV, Miranda MR, Campos-Estrada C, Reigada C, Maya JD, Pereira CA, López-Muñoz R. Pentamidine exerts *in vitro* and *in vivo* anti *Trypanosoma cruzi* activity and inhibits the polyamine transport in *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop* 2014, Jun;134:1-9.

Diniz Lde F, Caldas IS, Guedes PM, Crepalde G, de Lana M, Carneiro CM, Talvani A, Urbina JA, Bahia MT. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemotherapy* 2010, 54(7):2979-86.

Drugs for Neglected Diseases Initiative (DNDi). Disponível em: <http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/chagas.html> (Acessado em 10 de set 2015).

Don R, Ioset JR. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology* 2014, 141(1):140-6.

Farahat AA, Paliakov E, Kumar A, Barghash AE, Goda FE, Eisa HM, Wenzler T, Brun R, Liu Y, Wilson WD, Boykin DW.. Exploration of larger central ring linkers in furamidine analogues: synthesis and evaluation of their DNA binding, antiparasitic and fluorescence properties. *Bioorg Med Chem* 2011,1; 19(7):2156-67. doi: 10.1016/j.bmc.2011.02.045.

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

França TCC, dos Santos MG, Figueroa-Villar JD. Malária: Aspectos Históricos E Quimioterapia. *Quim. Nova* 2008, 31(5), 1271-1278.

Ferreira MES, Gomes M do SM, Vieira JLF. Metemoglobinemia em pacientes com malária por *Plasmodium vivax* em uso oral de primaquina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2011, 44(1):113-115.

Green J. "Synthesis of Aza-Heterocyclic Monoamidines as Potential DNA Minor Groove Binders, Anti-Trypanosomals, and Boron Neutron Capture Therapy Agents." Dissertation, Georgia State University 2014. Disponível em: http://scholarworks.gsu.edu/chemistry_diss/101 (Acessado em 10 de set 2015).

Gillingwater K, Kumar A, Ismail MA, Arafa RK, Stephens CE, Boykin DW, Tidwell RR, Brun R. *In vitro* activity and preliminary toxicity of various diamidine compounds against *Trypanosoma evansi*. *Vet Parasitol* 2010,11; 169(3-4):264-72. 2010. doi: 10.1016/j.vetpar.2010.01.019

Gregson A, Plowe C V. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev* 2005, 57(1):117-45.

Guhl F. Chagas disease in Andean countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007,v.102 (Suppl. I): 29-37.

Gopinath VS, Pinjari J, Dere RT, Verma A, Vishwakarma P, Shivahare R, Moger M, Kumar Goud OS, Ramanathan V, Bose P, Rao M V, Gupta S, Puri SK, Launay D, Martin D. *Eur. J. Med. Chem* 2013, 69, 527.

Gopinath VS, Rao M, Shivahare R, Vishwakarma P, Ghose S, Pradhan A, Hindupur R, Sarma KD, Gupta S, Puri SK, Launay D, Martin D. Design, synthesis, ADME characterization and antileishmanial evaluation of novel substituted quinoline analogs. *Bioorg Med Chem Lett* 2014,1;24(9):2046-52. .

Hernández-Chinea C, Carbajo E, Sojo F, Arvelo F, Kouznetsov VV, Romero-Bohórquez AR, Romero PJ. *In vitro* activity of synthetic tetrahydroindeno [2,1-c] quinolines on *Leishmania mexicana*. *Parasitol Int* 2015, 64(6):479-83.

Hiltensperger G, Jones NG, Niedermeier S, Stich A, Kaiser M, Jung J, Puhl S, Damme A, Braunschweig H, Meinel L, Engstler M, Holzgrabe U. Synthesis and structure-activity relationships of new quinolone-type molecules against *Trypanosoma brucei*. *J Med Chem* 2012, 22;55(6):2538-48.

- Ismail MA, Brun R, Wenzler T, Tanious FA, Wilson WD, Boykin DW. Dicationic biphenyl benzimidazole derivatives as antiprotozoal agents. *Bioorg Med Chem* 2004, 15;12(20):5405-13.
- Jackson Y, Alirol E, Getaz L, Wolff H, Combescure C, Chappuis F. Tolerance and safety of nifurtimox in patients with chronic chagas disease. *Clin Infect Dis* 2010, 51(10): e 69-75.
- Keenan M, Chaplin JH. A new era for chagas disease drug discovery? *Prog Med Chem* 2015,54:185-230.
- King H, Lourie EM. New trypanocidal substances. *The Lancet* 1937,.v.230, p. 1360 – 136.
- Kropf SP. Doença de Chagas: a construção de um fato científico e de um problema de saúde pública no Brasil. *Ciência e Saúde Coletiva* (1909-1962). 546 f. Tese (Doutorado em História Social) — Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.
- Lam KH, Lee KK, Gambari R, Kok SH, Kok TW, Chan AS, Bian ZX, Wong WY, Wong RS, Lau FY, Tong SW, Chan KW, Cheng CH, Chui CH, Tang JC. Anti-tumour and pharmacokinetics study of 2-formyl-8-hydroxyquinolinium chloride as Galipea longiflora alkaloid analogue. *Phytomedicine* 2014, 21(6), 877–882.
- Lam KH, Gambari R, Lee KKH et al. Preparation of 8-hydroxyquinoline derivatives as potential antibiotics against *Staphylococcus aureus*. *Bioorg. Med. Chem. Lett* 2014, 24(1),367–370.
- Malafaia G, Rodrigues AS. Centenary of the discovery of Chagas disease: challenges and prospects. *Rev Soc Bras Med Trop* 2010, 43(5):483-5.

- Marin-Neto JA, Rassi AJr, Morillo CA, Avezum A, Connolly SJ, Sosa-Estani S, Rosas F, Yusuf S and BENEFIT I. Rationale and design of a randomized placebo-controlled trial assessing the effects of etiologic treatment in Chagas' cardiomyopathy: the Benznidazole Evaluation For Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT). *Am Heart J* 2008,156(1):37-43. doi: 10.1016/j.ahj.2008.04.001.
- Mathis AM, Bridges AS, Ismail MA, Kumar A, Francesconi I, Anbazhagan M, Hu Q, Tanious FA, Wenzler T, Saulter J, Wilson WD, Brun R, Boykin DW, Tidwell RR, Hall JE. Diphenyl furans and aza analogs: effects of structural modification on *in vitro* activity, DNA binding, and accumulation and distribution in trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(8): 2801-10.
- Mathis AM, Holman JL, Sturk LM, Ismail MA, Boykin DW, Tidwell RR, Hall JE. Accumulation and intracellular distribution of antitrypanosomal diamidine compounds DB75 and DB820 in African trypanosomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2006, 50(6):2185-91.
- Meirelles MN, De Araujo-Jorge TC, Miranda CF, De Souza W, Barbosa HS. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *Eur J Cell Biol* 1986, 41(2):198-206.
- Molina I, Salvador F, Sánchez-Montalvá A. The use of posaconazole against Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 2015, 28(5):397-407.
- Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, Pou D, Roure S, Cabezos J, Valerio L, Blanco-Grau A, Sánchez-Montalvá A, Vidal X, Pahissa A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med* 2014, 15;370(20):1899-908. doi: 10.1056/NEJMoa1313122.

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

Mbwambo ZH, Kapingu MC, Moshi MJ, Machumi F, Apers S, Cos P, Ferreira D, Marais JP, Vanden Berghe D, Maes L, Vlietinck A, Pieters L. Antiparasitic activity of some xanthenes and biflavonoids from the root bark of *Garcinia livingstonei*. *J Nat Prod* 2006, 69(3):369-72.

O'Neill PM, Ward SA, Berry NG, Jeyadevan JP, Biagini GA, Asadollaly E, Park BK, Bray PG. A medicinal chemistry perspective on 4-aminoquinoline antimalarial drugs. *Curr Top Med Chem* 2006, 6 (5):479-507.

O'Neill PM, Barton VE, Ward SA. The molecular mechanism of action of artemisinin--the debate continues. *Molecules* 2010, 15(3):1705-21.

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(1):73-80.

Paine MF, Wang MZ, Generaux CN, Boykin DW, Wilson WD, De Koning HP, Olson CA, Pohlig G, Burri C, Brun R, Murilla GA, Thuita JK, Barrett MP, Tidwell RR. Diamidines for human African trypanosomiasis. *Curr Opin Investig Drugs* 2010, 11(8):876-83.

- Patterson S, Wyllie S. Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects. *Trends Parasitology* 2014, 30(6):289-98.
- Pires DE, Blundell TL, Ascher DB. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. *J Med Chem* 2015, 14; 58(9):4066-72. doi: 10.1021/acs.jmedchem.5b00104.
- Pomel S, Dubar F, Forge D, Loiseau PM, Biot C. New heterocyclic compounds: Synthesis and antitrypanosomal properties. *Bioorg Med Chem* 2015, 15;23(16):5168-74.
- Rassi A Jr, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am* 2012, 26(2):275-91.
- Ratheesh M, Sindhu G, Helen A. Anti-inflammatory effect of quinoline alkaloid skimmianine isolated from *Ruta graveolens* L. *Inflamm Res* 2013, 62(4):367-76.
- Reynolds KA, Loughlin WA, Young DJ. Quinolines as chemotherapeutic agents for leishmaniasis. *Mini Rev Med Chem* 2013, 1; 13 (5):730-43.
- Romaña C. Acerca de unsintomainicial de valor para el diagnostico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanozóica unilateral (hipotesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). *Publ Mis Estud Pat Reg Argent* 1935, v.22, p. 16-28.
- Romanha AJ, Castro SL, Soeiro Mde N, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, Bourdin B, Blum B, Olivieri B, Zani C, Spadafora C, Chiari E, Chatelain E, Chaves G, Calzada JE, Bustamante JM, Freitas-Junior LH, Romero LI, Bahia MT, Lotrowska M, Soares M, Andrade SG, Armstrong T, Degraeve W, Andrade Zde A. *In vitro* and *in vivo* experimental models for drug screening and

development for Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz 2010, 105(2):233-8.

Rosypal AC, Werbovets KA, Salem M, Stephens CE, Kumar A, Boykin DW, Hall JE, Tidwell RR. Inhibition by Dications of *in vitro* growth of *Leishmania major* and *Leishmania tropica*: causative agents of old world cutaneous leishmaniasis. J Parasitol 2008, 94(3):743-9.

Schorer M, Debache K, Barna F, Monney T, Müller J, Boykin DW, Stephens CE, Hemphill A. Di-cationic arylimidamides act against *Neospora caninum* tachyzoites by interference in membrane structure and nucleolar integrity and are active against challenge infection in mice. Int J Parasitol Drugs Drug Resist 2012, 2:109-20.

Simões-Silva MR, Nefertiti ASG, De Araújo JS, Batista MM, Da Silva PB, Bahia MT, Menna-Barreto RS, Pavão BP, Green J, Farahat AA, Kumar A, Boykin DW, Soeiro MNC. Phenotypic Screening *In Vitro* of Novel Aromatic Amidines Against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2016, 60(8):4701-7. doi: 10.1128/AAC.01788-15.

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.

Stephens CE, Brun R, Salem MM, Werbovets KA, Tanious F, Wilson WD, Boykin DW. The activity of diguanidino and 'reversed' diamidino 2, 5-diarylfurans versus *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. Bioorg Med Chem Lett. 16; 13(12):2065-9. 2003.

Soeiro MNC, De Souza EM, Stephens CE, Boykin DW. Aromatic diamidines as antiparasitic agents. Expert Opin Investig Drugs 2005, 14(8):957-72.

Soeiro MN, de Castro SL, de Souza EM, Batista DG, Silva CF, Boykin DW. Diamidine activity against trypanosomes: the state of the art. *Curr Mol Pharmacol* 2008, 1(2):151-61.

Soeiro MNC, Dantas AP, Daliry A, Silva CF, Batista DG, de Souza EM, Oliveira GM, Salomão K, Batista MM, Pacheco MG, Silva PB, Santa-Rita RM, Barreto RF, Boykin DW, Castro SL. Experimental chemotherapy for Chagas disease: 15 years of research contributions from *in vivo* and *in vitro* studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 104 Suppl 1:301-10. 2009.

Soeiro, MNC., Werbovetz, K., Boykin, D. W., Wilson, W. D., Wang, M. Z., Hemphill, A. Novel amidines and analogues as promising agents against intracellular parasites: a systematic review. *Parasitology*. Jul;140(8):929-51. 2013.

Teixeira DE, Benchimol M, Crepaldi PH, De Souza W. Atlas didático - O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 2011 Disponível em: <http://www.open.edu/openlearnworks/mod/page/view.php?id=40788>

(Acessado em: 27 de set. 2015).

Teixeira AR, Nitz N, Guimaro MC, Gomes C, Santos-Buch CA. Chagas disease. *Post graduate Medical Journal* 2006, v. 82(974):788-98.

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

- Upadhayaya RS, Dixit SS, Földesi A, Chattopadhyaya J. New antiprotozoal agents: their synthesis and biological evaluations. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 1;23(9):2750-8.
- Urbina JA, Payares G, Contreras LM, Liendo A, Sanoja C, Molina J, Piras M, Piras R, Perez N, Wincker P, Loebenberg D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrob Agents Chemother* 1998, 42(7):1771-7.
- Vale N, Moreira R, Gomes P. Primaquine revisited six decades after its discovery. *Primaquine Eur J Med Chem* 2009, 44(3):937-53.
- Vandekerckhove S, D'hooghe M. Quinoline-based antimalarial hybrid compounds. *Bioorg Med Chem* 2015,5;23(16):5098-119.
- Vandekerckhove S, Müller C, Vogt D, Lategan C, Smith PJ, Chibale K, De Kimpe N, D'hooghe M. Synthesis and antiplasmodial evaluation of novel (4-aminobutyloxy) quinolines. *Bioorg Med Chem Lett* 2013, 23(1):318-22.
- Viñas- Albajar P, Dias JC. Advancing the treatment for Chagas' disease. *N Engl J Med* 2014, 15; 370(20):1942-3.
- 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.
- Werbovetz K. Diamidines as antitrypanosomal, antileishmanial and antimalarial agents. *Curr Opin Investig Drugs* 2006, 7(2):147-57.

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* 2008, 1;105(13):5022-7.

Wilkinson SR, Kelly JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med* 2009, 29; 11:e31. doi: 10.1017/S1462399409001252.

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

World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> (Acessado em: 20 de set 2015).

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

Zhu X, Liu Q, Yang S, Parman T, Green CE, Mirsalis JC, Soeiro MNC, De Souza EM, Da Silva CF, Da Gama DJB, Stephens CE, Banerjee M, Farahat AA, Munde M, Wilson WD, Boykin DW, Wang MZ, Werbowetz 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.

Apêndice A – informações técnicas adicionais

As estruturas químicas das moléculas foram desenhadas no *Chem 3D*[®] *Ultra Molecular Modeling and Analysis*, Version 8.0, © 1985-2003 CambridgeSoft Corporation.

Os ensaios colorimétricos foram analisados com SoftMax[®] Pro software, v 5.4, © 1999-2009 MDS Analytical Technologies (US), no espectrofotômetro SpectraMax Plus 384 Microplate Reader / Molecular Devices.

Apêndice B – colaboração em trabalhos

Durante o mestrado, foi publicado um artigo referente a uma parte das atividades desenvolvidas durante o período de iniciação científica, intitulado “Activity of Marine Sponge-Derived Extracts Against *Trypanosoma cruzi* is Associated With Apoptosis-Like Death” na revista International Journal of Research Studies in Bio Sciences (IJRSB).

Além desse, outros dois artigos também foram recentemente publicados, ambos os artigos na revista Antimicrobial Agents and Chemotherapy, fruto de colaborações dentro do nosso próprio grupo de trabalho atual. O primeiro intitulado “Phenotypic Screening *In Vitro* of Novel Aromatic Amidines against *Trypanosoma cruzi* “ e o segundo intitulado “Antiparasitic effect *in vitro*, activity in a murine model of Chagas disease, and structural characterization in complex with the target enzyme CYP51 from *Trypanosoma cruzi* of the potent clinical candidate VT-1161.”

Activity of Marine Sponge-Derived Extracts against Trypanosoma Cruzi is Associated with Apoptosis-Like Death

Audrien Alves Andrade

Lab. de Inovação, Terapia, Ensino e Bioproducto/ Oswaldo Cruz Institute

Rio de Janeiro, Brazil

audrien.andrade@ioc.fiocruz.br

Aline Nefertiti Silva da Gama

Lab. de Biologia Celular/ Oswaldo Cruz
Institute

Rio de Janeiro, Brazil

alinenefertitigama@gmail.com

Georgia Correa Atella

Lab. de Bioquímica de Lipídeos e
Lipoproteínas/ Federal University of Rio de

Janeiro Rio de Janeiro, Brazil

atella@bioqmed.ufrj.br

Cristiano Carvalho Coutinho

Lab. de Evolução e Desenvolvimento/
Federal University of Rio de Janeiro

ccoutinho@histo.ufrj.br

Gabrielly Sbano Teixeira

Lab. de Inovação, Terapia, Ensino e
Bioproducto/

Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

sbano@ioc.fiocruz.br

Solange Lisboa de Castro

Lab. de Biologia Celular/
Oswaldo Cruz Institute

Rio de Janeiro, Brazil

solange@ioc.fiocruz.br

Elen Mello de Souza

Lab. de Morfologia e Morfogênese Viral/
Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil

elenmellodesouza@gmail.com

Abstract: *Trypanosoma cruzi* is the aetiological agent of Chagas disease that affects 6–7 million people in Latin America. Chemotherapy for this disease is unsatisfactory; therefore, it requires the development of new drugs. Marine sponges are known to be important sources of bioactive natural products. This present study investigated the activity of organic (E1) and aqueous (E2) extracts obtained from the sponge *Amphimedon viridis* against *T. cruzi* as well as their toxicity to mammalian cells. E1 and E2 displayed a dose-dependent lytic effect on bloodstream trypomastigotes with IC50 values of 10.80 and 0.57 µg/mL, respectively, being the aqueous extract ~19-fold more active than benznidazole; the corresponding values for effects on intracellular amastigotes were 44.85 and 21.37 µg/mL, respectively. Both *A. viridis* extracts were nontoxic to cardiac cells at a concentration of 100 µg/mL for up to 72 h of incubation. Trypomastigotes treated with 8 µg/mL E2 and labelling with TRME led to mitochondrial membrane potential dissipation on 78.7±26.8% of the parasites, whereas labelling with 7-AAD induced apoptosis-like death in 50.9±16.8% of parasites. These data suggest a potential trypanocidal activity of *A. viridis*, which is partially associated with the ability to induce apoptosis-like death. The bioactive compounds in E2 are currently being chemically characterized to further discriminate the active components involved.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, marine sponge, *Amphimedon viridis*, trypanocidal activity, apoptosis-like death.

Antimicrob Agents Chemother. 2016 May 23; pii: AAC.01788-15. [Epub ahead of print]

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

Simões-Silva MR¹, Nefertiti AS¹, De Araújo JS¹, Batista MM¹, Da Silva PB¹, Bahia MT², Menna-Barreto RS¹, Pavão BP¹, Green J³, Farahat AA⁴, Kumar A³, Boykin DW³, Soeiro MN⁵.

Author information

Abstract

The current treatment of Chagas disease (CD), based on Nifurtimox and Benznidazole (Bz), is unsatisfactory. In this context, we performed the phenotypic in vitro screening of novel mono- and di-amidines and drug interaction assays with selected compounds. Ten novel amidines were tested against bloodstream trypomastigotes (BT) and amastigote forms of *T. cruzi* (Y and Tulahuen) and their toxicity to mammalian host cells (L929 cells and cardiac cells). Seven of ten molecules were more active against BT than Bz, being the most active compound the diamidine DB2267 ($EC_{50} = 0.23 \mu\text{M}$ and $SI = 417$) which was 28-fold more active and about 3 times more selective than the standard drug. Also, five of the six monoamidines were more active than Bz. The combination of DB2267 and DB2236 in fixed-ratio proportions showed an additive effect ($\Sigma\text{FIC} < 4$) on BT. Interestingly, when intracellular forms were exposed to DB2267, its activity was dependent on the parasite strain, being effective ($EC_{50} = 0.87 \pm 0.05 \mu\text{M}$) against DTU II (Y strain) but not against one representative of DTU VI (Tulahuen) even using different vehicles (β -cyclodextrins and DMSO). The intrinsic fluorescence of several diamidines, allowed their uptake to be studied using DB2236 (inactive) and DB2267 (active), against amastigotes of the Y strain. Both compounds were localized intracellularly in different compartments: DB2236 in the cytoplasm and DB2267 in the nucleus. Our present data encourage further studies regarding the activity of amidines and provide information, which will help the identification of novel agents for CD.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

PMID: [27216059](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27216059/) DOI: [10.1128/AAC.01788-15](https://doi.org/10.1128/AAC.01788-15)

Showing results for a modified search because your search retrieved no results.

Antimicrob Agents Chemother. 2015 Dec 7;60(2):1058-66. doi: 10.1128/AAC.02287-15.

Clinical Candidate VT-1161's Antiparasitic Effect In Vitro, Activity in a Murine Model of Chagas Disease, and Structural Characterization in Complex with the Target Enzyme CYP51 from *Trypanosoma cruzi*.

Hoekstra WJ¹, Hargrove TY², Wawrzak Z³, da Gama Jaen Batista D⁴, da Silva CE⁴, Nefertiti AS⁴, Rachakonda G⁵, Schotzinger RJ¹, Villalta F⁶, Soeiro Mde N⁴, Lepesheva GI⁶.

Author information

¹Viamet Pharmaceuticals, Inc., Durham, North Carolina, USA.

²Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA.

³Synchrotron Research Center, Life Science Collaborative Access Team, Northwestern University, Argonne, Illinois, USA.

⁴Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁵Department of Microbiology and Immunology, Meharry Medical College, Nashville, Tennessee, USA.

⁶Department of Biochemistry, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, Tennessee, USA Center for Structural Biology, Vanderbilt University, Nashville, Tennessee, USA galina.i.lepesheva@vanderbilt.edu.

Abstract

A novel antifungal drug candidate, the 1-tetrazole-based agent VT-1161 [(R)-2-(2,4-difluorophenyl)-1,1-difluoro-3-(1H-tetrazol-1-yl)-1-[5-[4-(2,2,2-trifluoroethoxy)phenyl]pyridin-2-yl]propan-2-ol], which is currently in two phase 2b antifungal clinical trials, was found to be a tight-binding ligand (apparent dissociation constant [K_d], 24 nM) and a potent inhibitor of cytochrome P450 sterol 14 α -demethylase (CYP51) from the protozoan pathogen *Trypanosoma cruzi*. Moreover, VT-1161 revealed a high level of antiparasitic activity against amastigotes of the Tulahuen strain of *T. cruzi* in cellular experiments (50% effective concentration, 2.5 nM) and was active in vivo, causing >99.8% suppression of peak parasitemia in a mouse model of infection with the naturally drug-resistant Y strain of the parasite. The data strongly support the potential utility of VT-1161 in the treatment of Chagas disease. The structural characterization of *T. cruzi* CYP51 in complex with VT-1161 provides insights into the molecular basis for the compound's inhibitory potency and paves the way for the further rational development of this novel, tetrazole-based inhibitory chemotype both for antiprotozoan chemotherapy and for antifungal chemotherapy.

Copyright © 2016, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

PMID: [26843331](#) PMCID: [PMC4750653](#) [Available on 2016-09-01] DOI: [10.1128/AAC.02287-15](#)