

Caio Haddad Franco

**DESCOBERTA DE COMPOSTOS COM AMPLO ESPECTRO CONTRA
TRYPANOSOMA CRUZI POR MEIO DE TRIAGEM DE ALTO
CONTEÚDO**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

SÃO PAULO

2018

Caio Haddad Franco

**DESCOBERTA DE COMPOSTOS COM AMPLO ESPECTRO CONTRA
TRYPANOSOMA CRUZI POR MEIO DE TRIAGEM DE ALTO
CONTEÚDO**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para
obtenção do título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Dra. Carolina Borsoi Moraes

Coorientador: Dr. Lúcio Freitas Júnior

SÃO PAULO

2018

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Haddad Franco, Caio

Descoberta de compostos com amplo espectro contra *Trypanosoma cruzi* por meio de triagem de alto conteúdo / Caio Haddad Franco. - São Paulo, 2018.

viii, 181f.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia.

Título em inglês: Discovery of broad spectrum compounds against *Trypanosoma cruzi* throughout high content screening.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Triagem de alto conteúdo. 3. Descoberta de fármacos. 4. Fármacos de amplo espectro. 5. Esterol 14alfa-desmetilase (TcCYP51). 6. Microscopia automatizada.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

Chefe do Departamento: Profa. Dra. Isabel Cristina Affonso Scaletsky

Coordenador do curso de pós-graduação: Prof. Dr. Renato Arruda Mortara

Caio Haddad Franco

**DESCOBERTA DE COMPOSTOS COM AMPLO ESPECTRO CONTRA
TRYPANOSOMA CRUZI POR MEIO DE TRIAGEM DE ALTO
CONTEÚDO**

Presidente da banca: Dra. Carolina Borsoi Moraes

Banca examinadora:

Prof. Dr. André Gustavo Tempone Cardoso

Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Prof. Dr. Edécio Cunha-Neto

Prof. Dr. José Franco da Silveira Filho

À minha vó Marthinha

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Carolina e Lúcio, pelos anos de aprendizado e convivência, por confiarem em meu trabalho e me darem o apoio necessário para o desenvolvimento do projeto.

Ao Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) por proporcionar excelente infraestrutura para a realização do projeto;

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia, da UNIFESP, aos professores da comissão de pós-graduação, aos professores Rosana Puccia, Renato Mortara e José Franco, que compuseram minha banca de qualificação, e aos funcionários do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, em especial à Mércia Maia, pelo apoio durante o doutorado;

Ao Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Tripanossomatídeos, da UNIFESP, ao Prof. Sérgio Schenkman e seu grupo por disponibilizarem estrutura, material, apoio e por me fazerem sentir como parte do grupo;

Aos parceiros DNDi, na figura de Eric Chatelain, e Comissão Europeia, pelo apoio financeiro e científico. O suporte de todos os envolvidos foi de suma importância para o planejamento e execução do projeto;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto com a bolsa de doutorado;

A todos os colaboradores que fizeram parte desse projeto, em especial a: Prof. Philippe Grellier (Museu Nacional de História Natural, Universidade de Sorbonne), Prof. Simon Cämmerer (Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP), Profa. Elizabeth Ferreira (Universidade de São Paulo, USP), Prof. Hélio Stefani (USP), Prof. Carlos Montanari (USP), Prof. Leoberto Tavares (USP) e Profa. Valéria Maia Oliveira (UNICAMP). Obrigado a vocês e aos alunos envolvidos, por confiarem em nosso trabalho e pela oportunidade da colaboração;

Aos membros do nosso grupo: Luisa, Bruno, Camila, Cláudia, Beto, Denise, Giovana, Nicolli, Rafaela, Thalita, Vanessa e Valber. Todos contribuíram muito, tanto profissionalmente como pessoalmente, para o desenvolvimento deste projeto;

A Laura, uma companheira de trabalho e da vida, muito obrigado por me ajudar e me apoiar nessa etapa e em tantas outras dessa minha jornada. Te amo muito;

À minha família, minha mãe Salumita e meu pai José Gilmar por todo apoio e pelo amor incondicional, às minhas irmãs Luisa e Maria com quem compartilho todo esse carinho e fazem a minha vida mais divertida. Às minhas primas Isadora e Renata, por deixarem meu convívio em São Paulo bem mais gostoso. Às minhas afilhadas Alice e Rafaela, por poder ver vocês crescerem na certeza de um futuro brilhante.

RESUMO

A tecnologia de *high content screening* (HCS) permite a triagem de uma grande quantidade de moléculas dentro de um período relativamente curto de forma eficiente e robusta. Sabendo que o *Trypanosoma cruzi* é promíscuo em relação a infecção de células hospedeiras de mamíferos para ensaios *in vitro*, praticamente qualquer célula nucleada pode ser usada para triagem fenotípica. No entanto, a dinâmica celular e as interações parasito-hospedeiro podem desempenhar um papel importante nos resultados de triagem e seleção de compostos. Além disso, *T. cruzi* é uma espécie heterogênea subdividida em seis grupos filogenéticos distintos que também podem apresentar variabilidade na susceptibilidade aos diferentes compostos testados *in vitro* e *in vivo*. Um ensaio de HCS para a forma intracelular de diferentes cepas de *T. cruzi* e em tipos de células hospedeiras distintas foi desenvolvido e validado. Em seguida uma biblioteca contendo 1.604 compostos foi submetida ao processo de triagem no qual foi identificado e confirmado um composto análogo a auaquina D, com atividade inédita anti-*T. cruzi*. Em relação ao ensaio com diferentes cepas, a biblioteca Pathogen Box foi triada contra as cepas de *T. cruzi* Sylvio X10/1, Y clH10 e CL Brener, apresentando um perfil distinto de atividade para cada uma. Das 400 amostras testadas, os compostos MMV689028, MMV689029, MMV688958 e MMV688795 foram os únicos selecionados contra as três cepas. Apesar de conhecidas como agentes anti-kineoplastídeos, o amplo espectro de ação dessas moléculas contra as cepas de *T. cruzi* nunca havia sido explorado. A fim de verificar o efeito da célula hospedeira utilizada no ensaio de alto conteúdo, e sua consequência na seleção de *hits*, 1.280 compostos foram testados contra amastigotas infectando células das linhagens U2OS, THP-1, VERO e L6. Observamos que existe uma sobreposição muito baixa de compostos selecionados quando células hospedeiras distintas são utilizadas em *screening* de compostos contra *T. cruzi*. Os ensaios confirmatórios destacaram os compostos CB1954, FPL64176, AEG3482 e entecavir pela potência e seletividade satisfatórias. Uma outra abordagem na qual empregamos a técnica de *high content screening* foi o estudo de resistência de *T. cruzi* aos compostos azólicos e inibidores de CYP51, proposto por muitos como um alvo validado para a quimioterapia de doença de Chagas. Um clone da cepa Y foi cultivado sob concentrações crescentes de ravuconazol, até atingir estabilidade *in vitro* sob 500 nM. O clone resistente exibiu uma taxa de infecção reduzida e um baixo número de amastigotas intracelulares, quando comparado ao clone parental, *in vitro*. O clone resistente também apresentou um processo de epimastigogênese lento e diminuiu o tempo de duplicação de população de epimastigota. Nos ensaios de atividade de fármacos, o ravuconazol foi pelo menos 1.000 vezes menos potente no clone resistente e o fenótipo foi mantido mesmo após várias semanas sem a pressão do composto e também após submeter o parasita a um ciclo de vida completo *in vitro*. O clone resistente ao ravuconazol também mostrou resistência cruzada a outros inibidores azólicos e não azólicos da CYP51, mas não aos nitroheterocíclicos benzimidazol e nifurtimox, que agem sob outro mecanismo de ação. Uma nova mutação na TcCYP51 foi identificada no clone resistente. Espera-se que estes resultados auxiliem no entendimento da resistência natural de algumas cepas de *T. cruzi* aos inibidores de CYP51 e permita um maior entendimento do papel das isoformas de CYP51 na biologia do parasita. Os resultados obtidos nesse estudo apontam para novas perspectivas na descoberta e desenvolvimento de fármacos para doença de Chagas.

ABSTRACT

The high content screening (HCS) technology allows the evaluation of a large number of molecules within a relatively short period of time in an efficient and robust manner. It is well known that *Trypanosoma cruzi* is promiscuous in terms of mammalian cells infection for *in vitro* assays, therefore, basically any nucleated cell can be used for phenotypic screening against this parasite. However, cellular dynamics and the specific host-parasite interactions may play important role in the screening results and in hit compound selection. Besides, *T. cruzi* is a heterogeneous species subdivided into six distinct phylogenetic groups which may present variable susceptibility to different compounds tested both *in vitro* and *in vivo*. A HCS assay was developed and validated using the intracellular stage of different *T. cruzi* strains and several host cell types. Next, a 1,604-sample library was screened and an aurachin D analogue compound was identified and confirmed with a previously undescribed anti-*T. cruzi* activity. Regarding the different strains assay, the Pathogen Box library was screened against *T. cruzi* strains Sylvio X10/1, Y clH10 e CL Brener, presenting a distinct activity profile for each infected cell lineage. From the 400 samples tested, compounds MMV689028, MMV689029 MMV688958 e MMV688795 were the only hits selected against all three strains. Although these molecules are known anti-kinetoplastid agents, the broad-spectrum profile against different *T. cruzi* strains had not been explored yet. In order to evaluate the host cell type in *T. cruzi* high content assays, and the implications with compound selection, 1,280 compounds were tested against *T. cruzi* amastigotes infecting four host cell lineages: U2OS, THP-1, VERO e L6. We observed a low overlap of selected compounds within distinct host cells used in anti-*T. cruzi* compound screening. After confirmatory assays, compounds CB1954, FPL64176, AEG3482 and entecavir stood out in terms of potency, efficacy and selectivity. Another study in which we applied the high content assay methodology was on *T. cruzi* drug-induced resistance against azoles and other CYP51 inhibitors, considered by many as a well-validated antichagasic chemotherapeutical target. A Y strain clone was cultivated under increasing ravuconazole concentrations until reaching *in vitro* stability at 500 nM. The resistant clone exhibited a reduced infection ratio profile and low number of intracellular amastigotes, when compared to susceptible parental clone, *in vitro*. The resistant parasites also presented a slower epimastigogenesis process and decreased the epimastigote doubling time. In drug activity assays, ravuconazole was at least 1,000 times less potent against the resistant clone and this phenotype was maintained after several weeks, even without drug pressure and also after submitting the parasite into a complete *in vitro* life cycle. Ravuconazole resistant clones also presented cross-resistance to other azole and non-azoles CYP51 inhibitors, but not to nitroheterocyclic compounds benznidazole and nifurtimox, which act via different mechanism of action. A novel TcCYP51 mutation was identified in the resistant parasites. We hope these results will aid the understanding of natural-resistance occurrence in some *T. cruzi* strains to CYP51 inhibitors, allowing also a better elucidation of the role of TcCYP51 different isoforms in the parasite biology. The results obtained from this study point towards new perspectives in Chagas disease drug discovery.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1.1. KINETOPLASTÍDEOS	1
1.1.2. <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	1
1.1.2.1. COMPLEXIDADE DA ESPÉCIE	1
1.1.2.2. CICLO DE VIDA	3
1.2. DOENÇA DE CHAGAS	4
1.2.1. TRANSMISSÃO E INFECÇÃO	4
1.2.2. ASPECTOS CLÍNICOS	5
1.2.3. EPIDEMIOLOGIA GERAL	7
1.2.4. ASPECTOS SOCIOECONÔMICOS	9
1.3. ESTRATÉGIAS DE COMBATE A DOENÇA DE CHAGAS	9
1.3.1. PROFILAXIA E COMBATE AO INSETO VETOR	9
1.3.2. ESTRATÉGIA DE VACINAÇÃO	10
1.4. DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO PARA DOENÇA DE CHAGAS	11
1.4.1. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS	11
1.4.2. QUIMIOTERAPIA ANTICHAGÁSICA ATUAL	12
1.5. TRIAGEM E DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS PARA DOENÇA DE CHAGAS	14
1.5.1. AVANÇOS RECENTES NA BUSCA POR AGENTES ANTICHAGÁSICOS	14
1.5.2. TRIAGEM DE COMPOSTOS EM ALTA VAZÃO (HTS) E ENSAIOS FENOTÍPICOS	22
1.6. ALVOS DE AGENTES QUIMIOTERÁPICOS CONTRA <i>T. CRUZI</i>	27
1.6.1. VIAS METABÓLICAS E BIOLOGIA CELULAR DE <i>T. CRUZI</i> : FOCO EM ALVOS TERAPÊUTICOS	27
1.6.2. LANOSTEROL 14-ALFA DESMETILASE (CYP51)	30
1.6.3. INIBIDORES AZÓLICOS E NÃO-AZÓLICOS DA TcCYP51	31
1.7. RESISTÊNCIA A FÁRMACOS EM <i>T. CRUZI</i>	35
2. OBJETIVOS	37
2.1. OBJETIVOS GERAIS	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
3. MATERIAIS E MÉTODOS	38
3.1. CÉLULAS DE MAMÍFEROS	38
3.1.1. L6	38
3.1.2. LLC-MK2	38
3.1.3. THP-1	39
3.1.4. U2OS	39
3.1.5. VERO	40
3.2. ORIGEM E CULTIVO DO <i>T. CRUZI</i>	40
3.2.1. CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> E CULTIVO DE TRIPOMASTIGOTAS DE CULTURA DE TECIDO	40
3.2.2. CLONES DE <i>T. CRUZI</i> E PROCESSO DE SELEÇÃO DE RESISTÊNCIA IN VITRO	42
AO RAVUCONAZOL	42
3.2.3. CULTURA DA FASE DE INSETO: DIFERENCIAÇÃO E CRESCIMENTO	44
3.2.4. METACICLOGÊNESE: CICLO DO PARASITA COMPLETO IN VITRO	46
3.3. OBTENÇÃO E PREPARO DOS COMPOSTOS	46
3.3.1. ORIGEM DOS COMPOSTOS	46
3.3.2. PREPARO DA SOLUÇÃO DE COMPOSTOS	46
3.4. BIBLIOTECAS DE COMPOSTOS	47
3.4.1. BIBLIOTECA MNHN	47
3.4.2. BIBLIOTECA LOPAC	47
3.4.3. BIBLIOTECA PATHOGEN BOX	48
3.5. ENSAIOS DE TRIAGEM DE COMPOSTOS CONTRA <i>T. CRUZI</i>	48
3.5.1. VALIDAÇÃO DO ENSAIO	48

3.5.2.PROTOCOLO 1 (72 H DE EXPOSIÇÃO AOS COMPOSTOS): TRIAGEM PRIMÁRIA – BIBLIOTECA MNHN .	49
3.5.3.PROTOCOLO 2 (96 H DE EXPOSIÇÃO AOS COMPOSTOS): TRIAGEM CONFIRMATÓRIA DA BIBLIOTECA MNHN E DEMAIS ENSAIOS	51
3.5.4.ADAPTAÇÃO DO PROTOCOLO DE ENSAIO PARA OUTRAS LINHAGENS CELULARES.....	52
3.5.5.ADAPTAÇÃO DO ENSAIO HCS PARA UM PAINEL DE CEPAS DE <i>T. CRUZI</i>	53
3.5.6.ADAPTAÇÃO DO ENSAIO HCS PARA DERIVADOS DO CLONE H10.....	54
3.5.7.TRIAGEM DAS BIBLIOTECAS LOPAC E PATHOGEN BOX.....	54
3.5.7.1.TRIAGEM DA BIBLIOTECA LOPAC	54
3.5.7.2.TRIAGEM DA BIBLIOTECA PATHOGEN BOX.....	55
3.5.8. ENSAIO DE CINÉTICA DE ATIVIDADE DOS COMPOSTOS CONTRA DERIVADOS DO CLONE H10.....	56
3.5.9. ENSAIO DE COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS HITS DA BIBLIOTECA LOPAC	57
3.5.10.FIXAÇÃO E COLORAÇÃO DAS PLACAS.....	57
3.5.11.AQUISIÇÃO E ANÁLISE DE IMAGENS	58
3.5.11.1.SISTEMA DE ALTO CONTEÚDO – DESENVOLVIMENTO NO EQUIPAMENTO OPERETTA	58
3.5.11.2.SISTEMA DE ALTO CONTEÚDO – ADAPTAÇÃO PARA O EQUIPAMENTO IN CELL 2200	62
3.6.ANÁLISE DE DADOS	67
3.6.1.NORMALIZAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS NA HCA	67
3.6.2.TRATAMENTO ESTATÍSTICO: COMPARAÇÃO ENTRE GRUPOS E CORRELAÇÃO	67
3.6.3.CONTROLE DE QUALIDADE DA TRIAGEM: FATOR Z'	67
3.6.4.ANÁLISE DE DADOS DE TRIAGEM DE BIBLIOTECAS	68
3.6.5.ANÁLISE DE DADOS DOS ENSAIOS DE COMBINAÇÃO DE COMPOSTOS	69
3.6.6.ANÁLISE DE RELAÇÃO DE ESTRUTURA ATIVIDADE (SAR) E ESTUDOS DE CLUSTERS FARMACOLÓGICOS	69
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
4.1.PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO PARA <i>T. CRUZI</i>	71
4.1.1.DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MÍNIMO DE IMAGENS POR POÇO.....	71
4.1.2.PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO PARA <i>T. CRUZI</i> : TESTANDO DIFERENTES CÉLULAS HOSPEDEIRAS	73
4.1.3.PADRONIZAÇÃO DO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO PARA <i>T. CRUZI</i> : ESCOLHA DA CEPA E ESTOQUE DO PARASITA E ANÁLISES COMPARATIVAS	74
4.1.4.AVALIAÇÃO DA REPRODUTIBILIDADE DO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO	78
4.1.5.SCALE-UP DO PROTOCOLO TRIAGEM E AVALIAÇÃO	79
4.1.6.PADRONIZAÇÃO E VALIDAÇÃO DO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO PARA DIFERENTES CEPAS DE <i>T. CRUZI</i>	80
4.2.TESTE DOS COMPOSTOS LEADS DO DNDI CONTRA O PAINEL DE CEPAS DE <i>T. CRUZI</i>	84
4.3.SCREENING DA BIBLIOTECA MNHN	88
4.3.1.TRIAGEM PRIMÁRIA E SELEÇÃO DE COMPOSTOS HITS	88
4.3.2. ENSAIO CONFIRMATÓRIO	91
4.3.3.O COMPOSTO HIT MNHN-1409: UM ANÁLOGO DA AURAQUINA D.....	93
4.3.4. ESTUDO PRELIMINAR DA RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE DOS ANÁLOGOS DE AURAQUINA D.....	97
4.4.INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CÉLULAS HOSPEDEIRAS HCS: TRIAGEM DA BIBLIOTECA LOPAC.....	99
4.4.1.ESCOLHA DAS CÉLULAS E AVALIAÇÕES MULTIPARAMÉTRICAS DOS DIFERENTES SISTEMAS PARASITA-CÉLULA HOSPEDEIRA NO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO	99
4.4.2.SCREENING DA BIBLIOTECA LOPAC CONTRA DIFERENTES CÉLULAS HOSPEDEIRAS INFECTADAS COM <i>T.</i> <i>CRUZI</i>	107
4.4.3.CONFIRMAÇÃO DE COMPOSTOS HITS CONTRA DIFERENTES CEPAS DE <i>T. CRUZI</i>	115
4.4.4.COMBINAÇÃO DOS COMPOSTOS HITS DA LOPAC COM FÁRMACOS REFERÊNCIA.....	122
4.5.INFLUÊNCIA DE DIFERENTES CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> EM HCS: TRIAGEM DA BIBLIOTECA PATHOGEN BOX	126
4.5.1.ESCOLHA DAS CEPAS E TESTE NO MODELO DO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO	126
4.5.2.SCREENING DA BIBLIOTECA PATHOGEN BOX CONTRA DIFERENTES CEPAS DE <i>T. CRUZI</i>	127
4.6.OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DOS DIFERENTES CLONES H10	134
4.7.TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE DOS CLONES H10 A DIFERENTES COMPOSTOS ANTI- <i>T. CRUZI</i>	139
4.9.TESTE COM OUTROS COMPOSTOS AZÓLICOS E NÃO-AZÓLICOS INIBIDORES DA CYP51.....	147
4.10.IDENTIFICAÇÃO DE UMA MUTAÇÃO INÉDITA NA CYP51 DOS CLONES RESISTENTES AO RAVUCONAZOL	150
5.CONSIDERAÇÕES FINAIS	150
6.BIBLIOGRAFIA	154
7.ANEXOS.....	182

ANEXO I:	185
ANEXO II:	186
ANEXO III:	187
ANEXO IV:	196
ANEXO V:	197
ANEXO VI:	198
ANEXO VII:	199
ANEXO VIII:	200
ANEXO IX:	201
ANEXO X:	202
ANEXO XI:	203
ANEXO XII:	204
ANEXO XIII:	205
ANEXO XIV:	206

LISTA DE FIGURAS E ESQUEMAS

FIGURA 1. DISTRIBUIÇÃO EPIDÊMICO-GEOGRÁFICA DOS DIFERENTES GRUPOS FILOGENÉTICOS (DTUs) QUE CLASSIFICAM O <i>T. CRUZI</i> .	3
FIGURA 2. CICLO DE VIDA DO <i>T. CRUZI</i> .	4
FIGURA 3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DAS FASES AGUDA E CRÔNICA DA DOENÇA DE CHAGAS.	7
FIGURA 4. DISTRIBUIÇÃO GLOBAL DOS CASOS DE INFECÇÃO COM <i>T. CRUZI</i> BASEADO EM ESTIMATIVAS OFICIAIS (2006 – 2010).	8
FIGURA 5. PANORAMA COM HISTÓRICO, AS PRINCIPAIS TENDÊNCIAS E PERSPECTIVAS NO DESCOBRIMENTO E DESENVOLVIMENTO DE FÁRMACOS PARA DOENÇA DE CHAGAS.	21
FIGURA 6. MODELO DA ESTRUTURA CRISTALOGRAFICA DA TcCYP51 COMPLEXADA COM O COMPOSTO POSACONAZOL.	31
FIGURA 7. INTERFACE DO SOFTWARE DE ANÁLISE DE ALTO CONTEÚDO HARMONY.	59
FIGURA 8. ETAPAS DO PROCESSAMENTO DE IMAGENS VIA SOFTWARE HARMONY.	65
FIGURA 9. INTERFACE DO SOFTWARE DE ANÁLISE DE ALTO CONTEÚDO IN CELL INVESTIGATOR.	65
FIGURA 10. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO MÍNIMO DE IMAGENS ADQUIRIDAS POR POÇO NO ENSAIO DE ALTO CONTEÚDO.	72
FIGURA 11. TESTE COM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULA HOSPEDEIRA.	77
FIGURA 12. DIFERENÇA NO PERFIL DE INFECÇÃO DOS ESTOQUES 1 E 2 DA CEPY NA CÉLULA U2OS EM UMA MESMA MICROPLACA DE 384 POÇOS.	77
FIGURA 13. COMPILAÇÃO DE CURVAS DE ATIVIDADE NORMALIZADA DO COMPOSTO REFERÊNCIA BENZNIDAZOL.	79
FIGURA 14. VARIAÇÃO NO PADRÃO DE INFECÇÃO DAS DIFERENTES CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> .	83
FIGURA 15. ATIVIDADE ANTI- <i>T. CRUZI</i> DE COMPOSTOS LEAD CONTRA O PAINEL DE CEPAS.	87
FIGURA 16. PERFIL GERAL DA ATIVIDADE DOS COMPOSTOS (POTÊNCIA E EFICÁCIA) FRENTE AO PAINEL DE CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> .	88
FIGURA 17. TRIAGEM DA BIBLIOTECA DE COMPOSTOS MNHN CONTRA <i>T. CRUZI</i> .	89
FIGURA 18. IMAGENS REPRESENTATIVAS DOS POÇOS CONTENDO COMPOSTOS HITS DA TRIAGEM DA BIBLIOTECA MNHN.	90
FIGURA 19. VARIAÇÃO DE PARÂMETROS ANALISADOS EM DIFERENTES CÉLULAS HOSPEDEIRAS INFECTADAS COM <i>T. CRUZI</i> EM MICROPLACAS DE 384 POÇOS.	103
FIGURA 20. DISTRIBUIÇÃO DOS PONTOS DOS CONTROLES NEGATIVO E POSITIVO DA TRIAGEM DA BIBLIOTECA LOPAC DAS DIFERENTES CÉLULAS HOSPEDEIRAS INFECTADAS COM CEPY DE <i>T. CRUZI</i> .	104
FIGURA 21. PERFIL DE ATIVIDADE DOS COMPOSTOS REFERÊNCIA BENZNIDAZOL E NIFURTIMOX CONTRA DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS INFECTADAS COM <i>T. CRUZI</i> .	106
FIGURA 22. ESQUEMA DE SELEÇÃO E DISTRIBUIÇÃO DE COMPOSTOS ORIUNDOS DA TRIAGEM DA BIBLIOTECA LOPAC NAS DIFERENTES LINHAGENS CELULARES INFECTADAS.	111
FIGURA 23. SELEÇÃO DE COMPOSTOS DA BIBLIOTECA LOPAC CONTRA LINHAGENS CELULARES DISTINTAS INFECTADAS COM <i>T. CRUZI</i> : PERFIS DOS CANDIDATOS A HITS.	113
FIGURA 24. AGRUPAMENTO HIERÁRQUICO EM CLUSTERS E DISTRIBUIÇÃO DE FREQUÊNCIA DE COMPOSTOS E FREQUÊNCIA DOS COMPOSTOS SELECIONADOS.	117
FIGURA 25. ENSAIOS DE CONFIRMAÇÃO DE COMPOSTOS HITS: TESTE EM DOSE-RESPOSTA CONTRA CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> Y, CL BRENER E SYLVIO X10/1.	121
FIGURA 26. ISOBOLOGRAMAS DE COMBINAÇÃO ENTRE HITS DA BIBLIOTECA LOPAC COM OS COMPOSTOS REFERÊNCIA.	123
FIGURA 27. PERFIL DE ATIVIDADE DOS COMPOSTOS BENZNIDAZOL E POSACONAZOL SOBRE CEPAS UTILIZADAS NA TRIAGEM DA BIBLIOTECA PATHOGEN BOX.	127
FIGURA 28. TRIAGEM DA BIBLIOTECA PATHOGEN BOX CONTRA CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> .	129
FIGURA 29. PERFIL DOS COMPOSTOS SELECIONADOS NA TRIAGEM DA PATHOGEN BOX PARA DIFERENTES CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> .	131
FIGURA 30. AVALIAÇÃO FENOTÍPICA DA INFECÇÃO POR CLONES DE <i>T. CRUZI</i> RESISTENTES E SUSCEPTÍVEIS AO RAVUCONAZOL.	137
FIGURA 31. A RESISTÊNCIA AO RAVUCONAZOL CORRELACIONA-SE COM O CRESCIMENTO REDUZIDO EM AMASTIGOTAS E EPIMASTIGOTAS.	139

FIGURA 32. SUSCETIBILIDADE DOS CLONES H10 AO RAVUCONAZOL	140
FIGURA 33. O CLONE H10 RESISTENTE AO RAVUCONAZOL TAMBÉM É RESISTENTE AO POSACONAZOL....	143
FIGURA 34. ENSAIO DE CINÉTICA DE MORTE (TIME-KILL) COM COMPOSTOS NITRO-HETEROCÍCLICOS CONTRA OS DIFERENTES CLONES H10.	145
FIGURA 35. ENSAIO DE CINÉTICA DE MORTE (TIME-KILL) COM COMPOSTOS TRIAZÓIS CONTRA OS DIFERENTES CLONES H10.	146
ESQUEMA 1. A VIA DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE ESTERÓIS EM DIFERENTES SERES VIVOS..	29
ESQUEMA 2. PRINCIPAIS INIBIDORES DE CYP51 UTILIZADOS COMO ANTI- <i>T. CRUZI</i>	34
ESQUEMA 3. ETAPAS DO ENSAIO DO PROTOCOLO 1 (72H).....	50
ESQUEMA 4. ETAPAS DO ENSAIO DO PROTOCOLO 2 (96 H).....	53
ESQUEMA 5 APARENTE RELAÇÃO ESTRUTURA ATIVIDADE (SAR) TRAÇADA A PARTIR DA ESTRUTURA DA AURAQUINA D NATURAL.....	99

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. FÁRMACOS ATUALMENTE DISPONÍVEIS PARA TRATAMENTO ETIOLÓGICO DA DOENÇA DE CHAGAS E SUAS CARACTERÍSTICAS.	14
TABELA 2. DIFERENTES PROTOCOLOS DE ENSAIOS DESENVOLVIDOS PARA TRIAGEM DE FÁRMACOS CONTRA <i>T. CRUZI</i> E SUAS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS.	25
TABELA 3. INFORMAÇÕES GERAIS SOBRE AS CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> UTILIZADAS NO ENSAIO DE HCS.	41
TABELA 4. NOMENCLATURA DE VARIANTES DE CULTURA DA CEPA Y.	44
TABELA 5. PARÂMETROS DA ANÁLISE DE ALTO CONTEÚDO PARA PROCESSAR IMAGENS OBTIDAS NO SCREENING DE <i>T. CRUZI</i> NO SOFTWARE HARMONY.	66
TABELA 6. AVALIAÇÃO DO AUMENTO DE ESCALA SOBRE OS PRINCIPAIS FATORES DO ENSAIO DE <i>T. CRUZI</i>	80
TABELA 7. DADOS MULTIPARAMÉTRICOS DO PERFIL DO ENSAIO COM CEPAS DISTINTAS DO <i>T. CRUZI</i>	82
TABELA 8 VALORES DE ATIVIDADE DE COMPOSTOS REFERÊNCIA CONTRA PAINEL DE CEPA DE <i>T. CRUZI</i>	84
TABELA 9 DADOS DOS HITS SELECIONADOS NO SCREENING PRIMÁRIO DA BIBLIOTECA MNHN.	90
TABELA 10. DADOS DO ENSAIO CONFIRMATÓRIO DOS HITS DA MNHN.	92
TABELA 11. DADOS REFERENTES AOS TESTES COM COMPOSTOS ANÁLOGOS DE AURAQUINA D.	95
TABELA 12. PARÂMETROS GERAIS DE <i>SCREENING</i> DE ALTO CONTEÚDO PRODUZIDOS PELA INFECÇÃO POR CEPA DE <i>T. CRUZI</i> Y COM DIFERENTES LINHAGENS DE CÉLULAS HOSPEDEIRAS.	102
TABELA 13. CONFIRMAÇÃO DOS COMPOSTOS HITS DA LOPAC: COMPOSTOS TESTADOS EM DOSE-RESPOSTA CONTRA CÉLULAS U2OS INFECTADAS COM CEPA Y DE <i>T. CRUZI</i>	119
TABELA 14. PERFIL DE COMBINAÇÃO DO COMPOSTO REFERÊNCIA BENZNIDAZOL (BZL) COM OS COMPOSTOS SELECIONADOS DA BIBLIOTECA LOPAC FPL 64176 (FPL) E ENTECAVIR (ENT)	124
TABELA 15. PERFIL DE COMBINAÇÃO DO COMPOSTO REFERÊNCIA POSACONAZOL (PSL) COM OS COMPOSTOS SELECIONADOS DA BIBLIOTECA LOPAC FPL 64176 (FPL) E ENTECAVIR (ENT)	125
TABELA 16. LISTA DOS COMPOSTOS HITS SELECIONADOS NA BIBLIOTECA PATHOGEN BOX COM OS RESPECTIVOS VALORES DE ATIVIDADE NORMALIZADA (EM %) PARA CADA CEPA DE <i>T. CRUZI</i> TESTADA.	133
TABELA 17. ATIVIDADE DO RAVUCONAZOL CONTRA DIFERENTES CLONES H0 DE <i>T. CRUZI</i> EM DIFERENTES TEMPOS DE EXPOSIÇÃO (48, 96 E 120 HORAS).	140
TABELA 18. COMPARAÇÃO ENTRE VALORES DE EC50 E ATIVIDADE MÁXIMA PARA COMPOSTOS REFERÊNCIA BENZNIDAZOL, NIFURTIMOX E POSACONAZOL CONTRA CLONES H10.	142
TABELA 19. RESISTÊNCIA AOS COMPOSTOS TRIAZÓIS É CONSERVADA MESMO APÓS PASSAGEM DOS CLONES PELO CICLO COMPLETO <i>IN VITRO</i>	143
TABELA 20. FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS E MÉDIA DA TAXA DE INFECÇÃO NORMALIZADA (%) EM 72, 96, E 120 H DE EXPOSIÇÃO CONTÍNUA DO CLONE H10-S AOS COMPOSTOS BENZNIDAZOL, NIFURTIMOX, POSACONAZOL E RAVUCONAZOL.	147
TABELA 21. FAIXA DE CONCENTRAÇÃO DOS COMPOSTOS E MÉDIA DA TAXA DE INFECÇÃO NORMALIZADA (%) EM 72, 96, E 120 H DE EXPOSIÇÃO CONTÍNUA DO CLONE H10-R AOS COMPOSTOS BENZNIDAZOL, NIFURTIMOX, POSACONAZOL E RAVUCONAZOL.	148
TABELA 22. ATIVIDADE ANTI- <i>T. CRUZI</i> DA ANFOTERICINA B, AZÓIS E FENARIMÓIS CONTRA OS CLONES H10-S E H10-R.	149

1. INTRODUÇÃO

1.1.1 Kinetoplastídeos

A classe Kinetoplastea (1) agrupa organismos protozoários heterotróficos flagelados, denominados kinetoplastídeos, que apresentam uma típica estrutura granular rica em DNA extranuclear na mitocôndria: o cinetoplasto (ou kinetoplasto). Atualmente a classe é dividida em duas subclasses: Prokinetoplastina e Metakinetoplastina (2,3), sendo que a última engloba a ordem Trypanosomatida, na qual agrupam-se espécies estritamente parasitárias e causadoras de doenças severas em humanos, além de serem responsáveis por grandes perdas econômicas na agricultura e agropecuária (4).

Entre as espécies da ordem Trypanosomatida com importância médica, destacam-se principalmente aquelas associadas com a doença de Chagas, as leishmanioses e a doença do sono (HAT), sendo estas respectivamente causadas por *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* spp. e *Trypanosoma brucei* (duas subespécies: *T. b. rhodesiense* e *T. b. gambiense*) (5,6). Apesar dos esforços para tratamento de pacientes e erradicação dos vetores, os kinetoplastídeos ainda infectam aproximadamente 20 milhões de pessoas no mundo (7,8).

1.1.2. *Trypanosoma cruzi*

1.1.2.1 Complexidade da espécie

T. cruzi, o agente causador da doença de Chagas, foi identificado pelo médico brasileiro Carlos Chagas em 1909 (9). *T. cruzi* é considerado uma espécie heterogênea e geneticamente diversificada, classificando-se atualmente em seis linhagens genéticas ou grupos, também conhecidas como unidades discretas de tipagem (DTUs): TcI - TcVI (10). Recentemente, um sétimo grupo filogenético TcBat foi proposto (11). O agrupamento atual classifica as cepas de *T. cruzi* com maior proximidade genética entre si, em comparação com as demais, podendo

ser identificadas através de marcadores moleculares ou imunológicos comuns (12). A hipótese evolutiva mais aceita sugere que algumas das linhagens atuais originaram-se de eventos de hibridização entre organismos ancestrais (13,14).

Além da discreta divergência genética e bioquímica, os grupos parecem se distribuir de maneira distinta sob aspectos epidemiológicos e geográficos, ocorrendo ainda a predominância diferenciada nos ciclos selvático e doméstico (**figura 1**): grupos TcI, TcII, TcV e TcVI são associados comumente ao ciclo doméstico enquanto TcIII e TcIV ao ciclo selvático (15,16). Além disso, avaliações de tecidos e órgãos provenientes de pacientes chagásicos sugerem uma correlação entre o genótipo da cepa infectante e o desenvolvimento clínico da doença (17). Cepas de *T. cruzi* pertencentes ao grupo TcI estão relacionadas com infecções humanas na região andina, amazônica, na América Central e no México; sendo que as formas clínicas associadas a este grupo incluem a cardiomiopatia e meningoencefalite (no caso de pacientes imunocomprometidos); ademais, a identificação de um grupo divergente no TcI, denominado TcI_{DOM}, é responsável por uma proporção significativa de infecções humanas na região norte da Argentina, Colômbia e Venezuela (18,19). As cepas pertencentes aos grupos TcII, TcV e TcVI causam a maioria das infecções humanas na região do cone sul, sendo intimamente relacionadas com mega-síndromes chagásicas; enquanto aquelas pertencentes aos grupos TcIII e TcIV estão comumente associados ao ciclo selvático da transmissão, ocasionalmente infectando seres humanos (20). Originalmente identificada em morcegos, parasitas do grupo TcBat foram recentemente identificados em humanos (21). Apesar das diferenças mencionadas, todas as linhagens de *T. cruzi* são capazes de infectar humanos e causar a doença de Chagas (17, 16, 22).

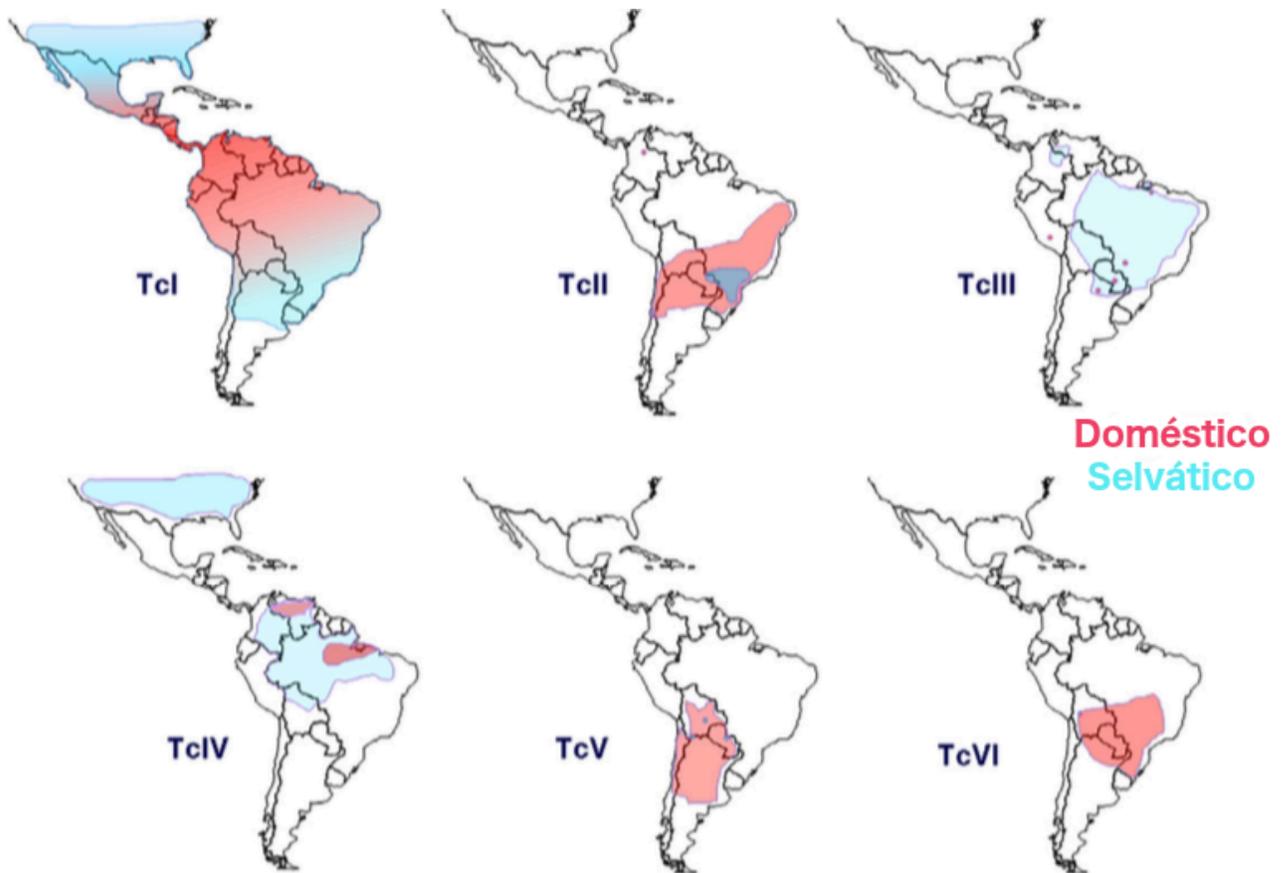


Figura 1. Distribuição epidêmico-geográfica dos diferentes grupos filogenéticos (DTUs) que classificam o *T. cruzi*. As localizações e predominâncias nos ciclos doméstico (vermelho) ou selvático (azul) pelos diferentes grupos (TcI – TcVI) nas regiões endêmicas estão demonstrados. Adaptado de (20)

1.1.2.2. Ciclo de vida

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e envolve tanto hospedeiros vertebrados como invertebrados (**figura 2**). Durante o ciclo, o parasita sofre diferenciação, podendo dividir-se em fases morfológicamente distintas: duas fases replicativas, o epimastigota flagelado, encontrado no lúmen do trato digestório do vetor, e o amastigota, que se multiplica no interior das células hospedeiras de mamíferos. Ambas as fases replicativas eventualmente podem originar a forma infecciosa flagelada: o tripomastigota. Esta última forma tripomastigota é transmitida pelo inseto vetor, sob a forma metacíclica, perpetuando a infecção em mamíferos; já o tripomastigota sanguíneo – originado do

amastigota – rompe as células hospedeiras para invadir outras células e tecidos, espalhando assim a infecção (23).

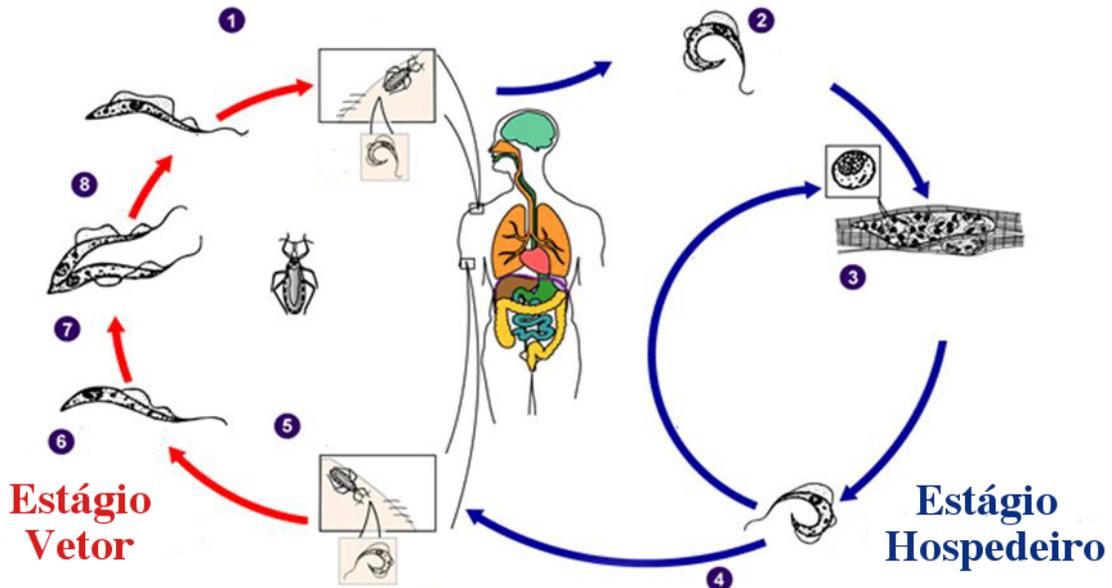


Figura 2. Ciclo de vida do *T. cruzi*. 1. Inseto triatomíneo infectado se alimenta do sangue de mamífero: tripomastigotas metacíclicos são secretados pelas fezes e invadem o organismo hospedeiro pelo local da picada ou via mucosa; 2. Tripomastigotas metacíclicos são altamente infectivos e penetram em diversas células próximas ao local da invasão; 3. Uma vez dentro das células do tecido infectado, tripomastigotas transformam-se em amastigotas, estágio replicativo no qual multiplicam-se por fissão binária; 4. Após alguns ciclos de divisão, amastigotas transformam-se em tripomastigotas que rompem as células, uma vez na corrente sanguínea os tripomastigotas podem invadir outras células (transformando-se novamente em amastigotas) ou eventualmente são ingeridos pelo inseto triatomíneo (5.); 6. Tripomastigotas transformam-se em epimastigotas no intestino médio do inseto vetor; 7. Epimastigotas multiplicam-se no intestino médio do barbeiro; 8. Epimastigotas diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos na região do reto do inseto, completando o ciclo biológico do *T. cruzi*. Adaptado de CDC (disponível em <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>).

1.2. Doença de Chagas

1.2.1 Transmissão e infecção

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase humana americana, é uma doença tropical negligenciada causada pelo *T. cruzi*. A principal forma de transmissão da doença ocorre durante a alimentação do inseto barbeiro (triatomíneo

hematófago da família Reduviidae/ ordem *Hemiptera*) pelo sangue de hospedeiros vertebrados, secretando fezes que contém a forma infectante do parasita; este material excretado é mecanicamente introduzido na ferida (ou outra abertura na pele/ mucosa) uma vez que o hospedeiro coça o local irritado da picada (24). Existem ~140 espécies de triatomíneos catalogadas, no entanto apenas algumas são vetores competentes para *T. cruzi*. Entre as principais espécies vetores destacam-se *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, e *Panstrongylus megistus* nos países do cone sul; já nos países andinos e em parte da América Central ocorrem as espécies *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata*; as espécies *Triatoma dimidiata* e *Triatoma barberi* estão presentes na região do México (25). Diversas espécies de mamíferos representam um reservatório natural de *T. cruzi*, sendo que o ciclo zoonótico é mantido entre animais silvestres, peri-domésticos ou domésticos e insetos triatomíneos, independente da presença humana.

Ocasionalmente, mamíferos também são infectados através da ingestão de alimentos e líquidos contaminados com a forma infectante do parasita (26). Além da via vetorial, a transmissão entre seres humanos também pode ocorrer por meio de transfusão de sangue, transplante de órgãos sólidos, ou congenitamente (27–29); casos de infecções acidentais em laboratórios e hospitais também já foram amplamente reportados (30). Recentemente a via de transmissão sexual foi proposta para a doença de Chagas como potencial rota de propagação pandêmica (31).

Uma vez no organismo do hospedeiro, o *T. cruzi* é capaz de invadir, diferenciar-se e multiplicar-se em virtualmente qualquer célula nucleada (32); no entanto, parece existir um tropismo diferencial de algumas cepas de *T. cruzi* por células específicas, como células musculares ou macrófagos (33–35). Tratando-se de um organismo intracelular obrigatório, esta etapa de invasão das células de mamíferos é essencial para garantir a proliferação do parasita, que pode levar a evolução e propagação da doença.

1.2.2 Aspectos clínicos

A doença de Chagas pode ser dividida em duas fases típicas: fase aguda e fase crônica. esta última podendo apresentar as formas clínicas ou não - forma indeterminada

- (36). Na maioria dos pacientes, a fase aguda é curta (4-8 semanas após a infecção), caracterizada pela elevada parasitemia e os sintomas, se apresentados, são brandos e genéricos (febre, conjuntivite, lesões na pele e edema local). Dependendo da forma de inoculação do parasita e de alguns fatores do hospedeiro, dois sinais característicos da doença de Chagas podem se manifestar: o chagoma, uma lesão inflamatória que circunda a região da ruptura da pele por onde o parasita penetrou no hospedeiro; e o sinal de Romaña, que se caracteriza por um edema indolor na pálpebra associado a uma conjuntivite (**Figura 3**) (37).

Os sintomas da fase aguda desaparecem espontaneamente com a redução da parasitemia - o que caracteriza a fase crônica da doença de Chagas – (exceto em casos de pacientes imunossuprimidos); a forma indeterminada ocorre em 70-80% dos pacientes; estes indivíduos podem seguir assintomáticos pelo resto a vida, podendo contribuir para a manutenção do ciclo de vida do parasita em regiões endêmicas, pois como ainda estão infectados, servem como reservatórios naturais do *T. cruzi*. Entretanto, 20-30% dos indivíduos infectados podem desenvolver a forma determinada, caracterizada por complicações severas com a progressão da doença em sua fase crônica: como o quadro de cardiomiopatia clínica progressiva, ou a forma digestiva da doença de Chagas, marcadas por um processo inflamatório crônico com alargamento dos músculos cardíacos e dos tecidos do trato digestório (**figura 3**), respectivamente (38). A complexa etiologia patológica da doença de Chagas ainda não é completamente compreendida, acredita-se que os danos teciduais podem ser mediados diretamente pela atividade citopática do *T. cruzi* combinada com danos indiretos causados pela resposta imune ao parasita e pela exposição de antígenos durante a infecção (37,39).

Eventualmente pacientes apresentam ambas as formas cardíaca e digestiva da doença de Chagas (40). Além disso, quadros de imunodepressão podem reativar a infecção naturalmente controlada do *T. cruzi* (41).

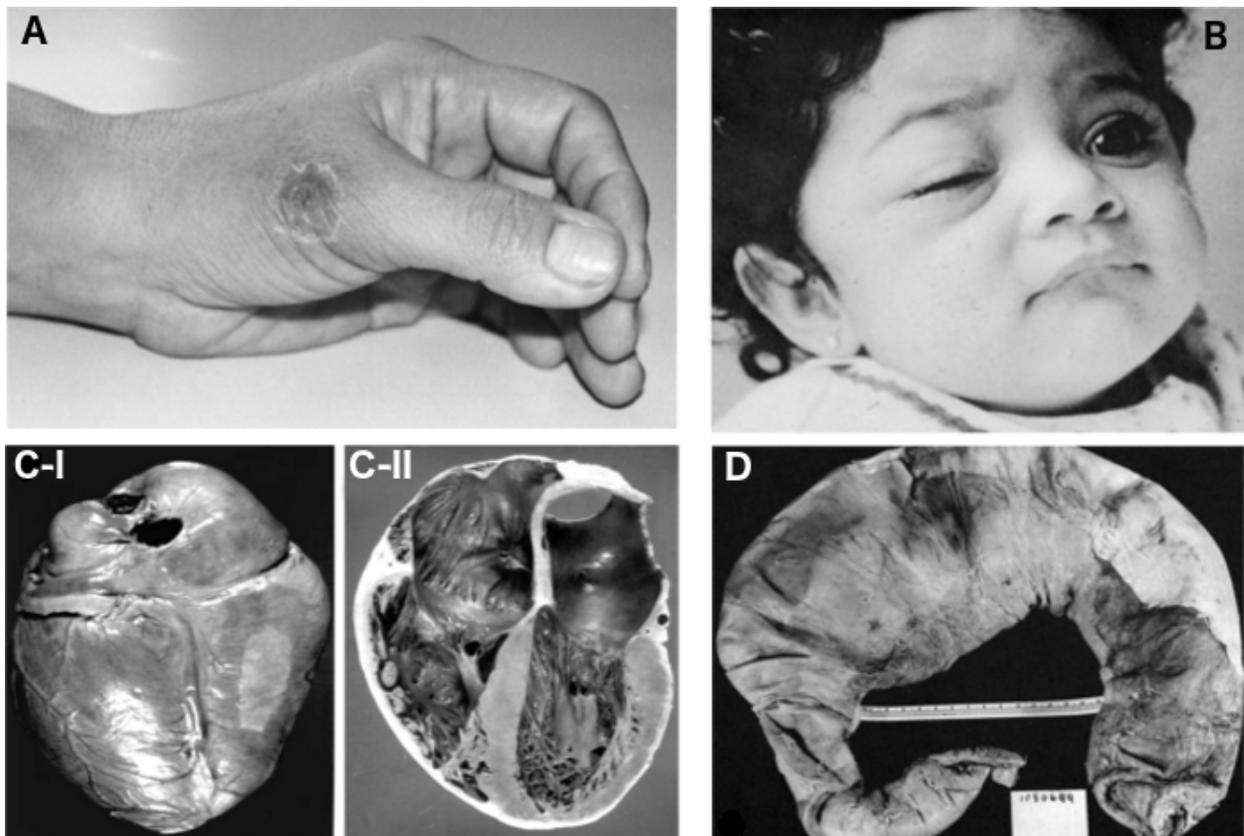


Figura 3. Manifestações clínicas das fases aguda e crônica da doença de Chagas. A. Chagoma na superfície dorsal da mão esquerda 21 dias após inoculação acidental com tripomastigotas; B. Criança com clássico sinal de Romaña; C. Manifestação cardíaca da fase crônica da doença de Chagas: I. Superfície superior do coração chagásico dilatado mostrando placas fibrosas e alargamento dos vasos coronários; II. Visão interior do corte cardíaco revela dilatação nas câmaras direita e esquerda do coração; D. Megacólon de paciente chagásico, porção distal do cólon extremamente distendida. Figuras adaptadas de *The imaging of tropical diseases* (disponível em http://www.isradiology.org/tropical_diseases/tmcr/main.htm).

1.2.3 Epidemiologia geral

Estima-se que aproximadamente oito milhões de pessoas estejam infectadas com o *T. cruzi* em todo o mundo (**figura 4**), a maioria dos casos concentra-se na América Latina onde > 10.000 mortes ocorrem anualmente, o que torna a doença de Chagas uma das parasitoses mais importantes na região (38).

Apesar de ser endêmica em 21 países latino-americanos, um recente aumento na incidência da doença de Chagas tem sido relatado em áreas não endêmicas, como Europa, Japão e Austrália, majoritariamente devido a tendências de emigração de indivíduos infectados da América Latina (42,43). Iniciativas de cooperação internacional,

envolvendo o controle do vetor, triagem de bancos de sangue e campanhas de educação sanitária, obtiveram sucesso na redução substancial na incidência de novos casos de doença de Chagas na América Latina (44); ainda assim, as taxas de prevalência mais elevadas foram reportadas na Bolívia (6,8%), Argentina (4,1%), El Salvador (3,4%), Honduras (3,1%) e Paraguai (2,5%). Apesar da prevalência de ~1% no Brasil e no México, esses países juntamente com Argentina somam quase 60% de todas as pessoas infectadas com *T. cruzi* na América Latina (37,45).

A estimativa de indivíduos infectados com *T. cruzi* no Brasil em 2013 era de 2 – 3 milhões, dos quais 600.000 apresentavam complicações cardíacas e/ou gastrointestinais (46). De acordo com um levantamento feito entre 1999 e 2007, a doença de Chagas foi responsável por ~6.000 mortes anuais - o que representava 0,6% das mortes do país; um relatório recente sugere, entretanto, que o número de mortes é subestimado já que as estimativas ignoraram casos de soropositivos assintomáticos (47,48). Nos países endêmicos da América Latina, a doença de Chagas é a principal causa de doenças cardíacas e de mortes associadas a complicações cardiovasculares (49).

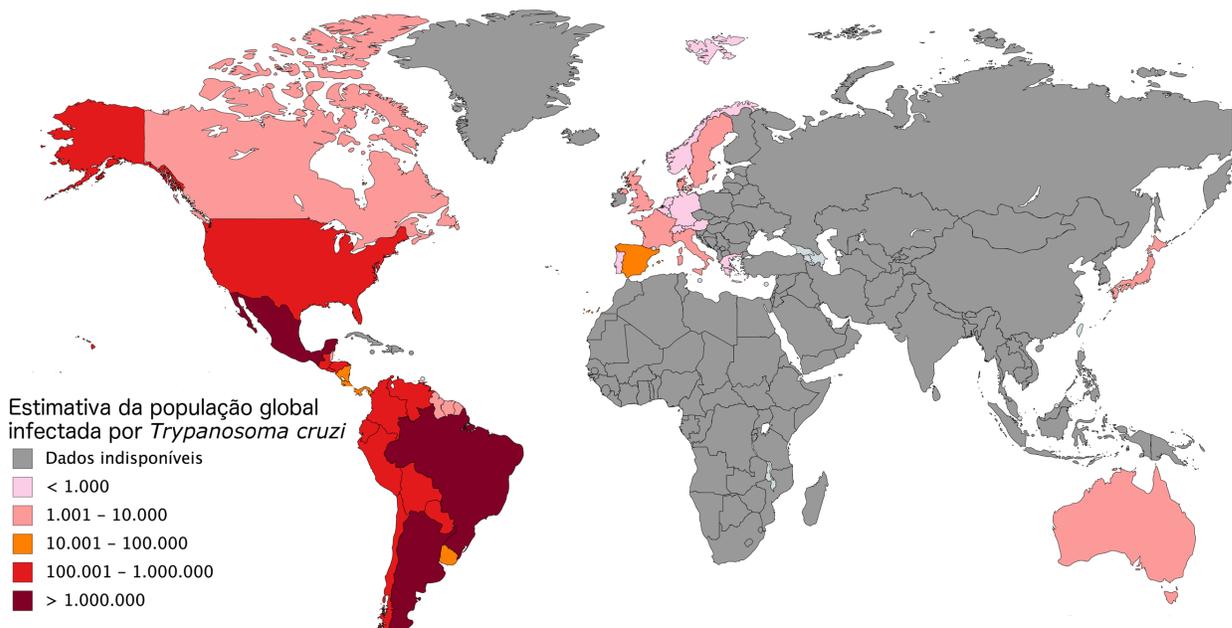


Figura 4. (página anterior) Distribuição global dos casos de infecção com *T. cruzi* baseado em estimativas oficiais (2006 – 2010). Fonte: (50). Mapa gerado via <https://mapchart.net>.

1.2.4 Aspectos socioeconômicos

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a doença de Chagas é responsável por uma perda de produtividade anual de US\$ 1.2 bilhões na América Latina, sendo considerada a doença parasitária com maior impacto socioeconômico na região (38). Em termos de anos perdidos ajustados por incapacidade (DALY), o valor anual médio de 0,51 DALYs está associado a um único indivíduo infectado com *T. cruzi*.

O peso econômico da doença de Chagas equipara-se a ou supera o de doenças de prevalência global como rotavírus e câncer cervical, levando em consideração os impactos na economia e os custos gerais de tratamento (51). Historicamente a doença de Chagas é típica de zonas rurais ou de mata, frequentemente associada a pobreza, más condições de higiene e habitação e hábitos de caça ou coleta silvestre; todavia, os intensos processos de urbanização, globalização e imigração elevaram substancialmente os casos autóctones em áreas não-endêmicas (52, 53). Ainda sob a perspectiva social, um estudo recente realizado na região nordeste do Brasil revelou uma associação direta entre a maior prevalência de doença de Chagas e taxas escolaridade mais reduzidas na população (54).

1.3 Estratégias de combate a doença de Chagas

1.3.1 Profilaxia e combate ao inseto vetor

A partir da década de 1990, diversas iniciativas foram criadas para eliminar os insetos vetores da doença de Chagas nas áreas domésticas e peri-domésticas, dada que a transmissão vetorial ainda é a forma na qual a doença de Chagas mais se dissemina nas regiões endêmicas. A Iniciativa dos Países do Cone Sul, lançada oficialmente em 1991, envolveu a colaboração internacional da Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai e focou na erradicação do principal inseto vetor regional, o *Triatoma infestans*, além da adoção de um processo mais rigoroso de triagem nos bancos de sangue. A eliminação dos triatomíneos dos domínios domésticos foi feita principalmente através do uso de inseticida em locais com potenciais infestações (55). Como resultado deste programa de cooperação, as infestações domiciliares foram eliminadas no Uruguai em

1997, no Chile em 1999 e no Brasil em 2006. Posteriormente, campanhas semelhantes foram adotadas por outros grupos de países: em 1997 com a Iniciativa dos Países Andinos e a Iniciativa dos Países Centro-americanos; já em 2004 foi lançada a Iniciativa Amazônica. Os programas da Iniciativa dos Países do Cone Sul e Iniciativa dos Países Centro-americanos foram os que alcançaram resultados mais significativos na interrupção da transmissão da doença de Chagas; ademais, uma redução de 40% no número de indivíduos sob risco de infecção foi reportada entre 2006 e 2010 na região dos Países do Cone Sul e a redução de 99,8% na incidência da doença de Chagas em crianças de 7–14 anos foi constatada entre os anos de 1980 e 1999 no Brasil (56). Apesar dos notáveis progressos destas campanhas, a abordagem realizada requer monitoramento e tratamento contínuo nas regiões que abrigam o ciclo selvático da doença e onde ainda ocorrem milhões de indivíduos infectados com o *T. cruzi* (57).

1.3.2 Estratégia de vacinação

Além das estratégias de controle de vetor, medidas educacionais, triagem de bancos de sangue e quimioterapia, o desenvolvimento de uma vacina anti-chagásica teria grande impacto sobre o controle da doença. Diversos laboratórios vêm tentando desenvolver uma vacina contra a doença de Chagas; atualmente existem duas propostas distintas de vacinação: uma de caráter profilático, cuja intenção é prevenir a infecção aguda, e a segunda tem caráter terapêutico e foca em indivíduos soropositivos na fase indeterminada; se executadas em campanhas bem coordenadas, ambas as propostas de vacinação (caso comprovadamente efetivas) exerceriam um grande impacto na redução da proliferação da doença (58,59). Uma estratégia alternativa propôs combinar os candidatos a vacina com o fármaco referência benznidazol a fim de reduzir a concentração deste composto, abrandando assim seu efeito tóxico (60)

Recentemente foram reportados 16 candidatos a vacinas anti-chagásicas em desenvolvimento, sendo que a maior parte (cinco) baseia os antígenos em proteínas recombinantes; há também aquelas baseadas em vetores de *Salmonella* e adenovírus, peptídeos, parasita vivo atenuado (*T. cruzi*) e parasita vivo não-atenuado (*T. rangeli*). Das 16 vacinas em desenvolvimento, 12 estão em fase de estudo pré-clínico em

camundongos, cachorros ou primatas não-humanos; até o momento nenhum candidato foi aprovado para testes em humanos (61). Além das questões de segurança e dos custos de produção, outros desafios desta estratégia são: a obtenção de uma vacina eficaz contra os estágios extra e intracelulares do parasita, abrangendo as diferentes cepas de *T. cruzi*.

1.4 Diagnóstico e tratamento para doença de Chagas

1.4.1 Métodos diagnósticos

Na fase aguda da doença de Chagas, exames parasitológicos convencionais são suficientes para diagnosticar a infecção com *T. cruzi*. Entretanto, a fase crônica da doença é caracterizada por parasitemia baixa ou intermitente, o que afeta a sensibilidade de exames parasitológicos diretos (como xenodiagnóstico ou hemocultura); metodologias sorológicas devem ser empregadas para detectar antígenos específicos no sangue do paciente em fase crônica. Além disso, os diferentes protocolos de preparo de antígenos e a variabilidade das cepas circulantes devem ser levadas em consideração (62).

Para um diagnóstico mais preciso da doença de Chagas, os governos e organizações de saúde recomendam que sejam executados, paralelamente, pelo menos dois tipos de ensaios imunológicos distintos, um deles sendo o ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e um segundo confirmatório, podendo ser imunofluorescência indireta ou hemaglutinação indireta (63,64). O ensaio de reação em cadeia da polimerase (PCR) é recomendado quando o teste sorológico é inconclusivo. No Brasil, um indivíduo é considerado positivo para infecção crônica da doença de Chagas se anticorpos anti-imunoglobulinas (IgG) de *T. cruzi* forem detectados utilizando dois testes sorológicos distintos; sendo fortemente recomendado o uso de um teste com alta sensibilidade (com antígeno total ou frações semi-purificadas do parasita) em combinação com outro teste de alta especificidade (utilizando antígenos específicos de *T. cruzi* ou antígenos recombinantes) (65). Ainda que sejam utilizadas ferramentas diagnósticas mais precisas para detectar a presença do parasita na fase crônica e no decorrer do tratamento, a cura parasitológica como combate a doença de Chagas ainda é intensivamente debatida pois

há hipóteses de que o parasita tenha uma participação parcial no desenvolvimento dos sintomas na fase crônica (66,67).

1.4.2 Quimioterapia antichagásica atual

Atualmente existem poucas opções de medicamentos para a quimioterapia da doença de Chagas; os compostos benzimidazole – BZL - (Rochagan/LAFEPE; Abarax/ELEA) e nifurtimox – NFX - (LAMPIT/Bayer) são os dois únicos medicamentos aprovados e disponíveis para o tratamento desta enfermidade. Ambos foram empiricamente introduzidos na terapia clínica há mais de quatro décadas e permanecem, até a presente data, como a única linha de tratamento disponível. Estes compostos são nitroheterocíclicos e atuam como pró-fármacos, sendo necessária a redução dos grupos funcionais nitro, mediada por enzimas nitrorredutases presente no parasita (68). Enquanto a redução de BZL leva a formação do metabólito citotóxico glioxal (69), a redução do NFX resulta na produção de nitrilas de cadeia aberta insaturada altamente reativas (70). O estresse oxidativo era apontado como o principal mecanismo dos efeitos anti-*T. cruzi* do NFX, cujas nitrilas reagiriam com oxigênio molecular, formando peróxido e superóxido (71); entretanto foi demonstrado que a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e ciclos redox não estavam presentes em concentrações efetivas do composto em *T. cruzi*, questionando, portanto, o mecanismo proposto (72). Já em relação ao BZL, foram constatadas modificações proteicas, lipídicas e no DNA pelos radicais livres intermediários e metabólitos nucleofílicos resultantes da biotransformação do composto por enzimas do parasita (73,74).

Tanto BZL como NFX podem curar a doença quando administradas durante a fase aguda, entretanto as taxas de cura durante a fase crônica parecem variar de acordo com a dosagem administrada, período de tratamento, além do perfil e região de origem dos pacientes (75–79). Se administrados durante a fase aguda, as taxas de cura variam de 60-80% em crianças e adultos; a eficácia dos medicamentos diminui na medida que a doença avança para fase crônica, produzindo uma taxa de cura parasitológica de 8-70%. BZL e NFX agem sobre a fase de amastigota intracelular e, em maior intensidade, contra o tripomastigta circulante na corrente sanguínea (80,81). Um estudo clínico randomizado

de fase III (BENEFIT – NCT00123916) demonstrou que o BZL não reduz significativamente os sintomas da cardiomiopatia chagásica em paciente crônicos sintomáticos, apesar da aparente redução da carga parasitária (82); atualmente, para mitigar os efeitos cardiomiopáticos da doença de Chagas são utilizadas fármacos cardíacos convencionais, como beta-bloqueadores, digitálicos, hidralazina, amiodarona, anticoagulantes, entre outros (83). Em crianças menores de 15 anos, na fase crônica recente da doença de Chagas, as taxas de cura dos compostos nitroheterocíclicos varia de 30-60% (64,84).

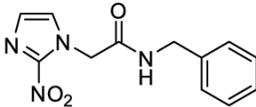
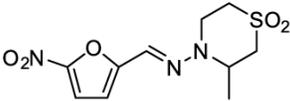
Os regimes de tratamento estabelecidos para quimioterapia atual da doença de Chagas são relativamente longos, com duração aproximada de 30-60 dias para BZL e de 60-90 dias para NFX. No Brasil, recomenda-se o tratamento anti-*T. cruzi* em todos os casos agudos e congênitos da doença de Chagas, em indivíduos menores de 18 anos infectados e em casos de pacientes crônicos reativados. Se os pacientes de idade entre 19 e 50 anos não apresentarem sintomas da doença cardíaca avançada, o tratamento também é recomendado; já para aqueles com mais de 50 anos, a quimioterapia antichagásica fica a critério do médico responsável. A comercialização do NFX foi interrompida no Brasil e em outros países sul-americanos, provavelmente devido a baixa eficácia em algumas regiões endêmicas – variação de susceptibilidade das diferentes cepas - (64,80).

Adicionalmente, BZL e NFX apresentam limitações significativas que distanciam a quimioterapia atual do tratamento ideal para a doença de Chagas; as principais desvantagens são a baixa tolerabilidade, alta incidência de efeitos colaterais tóxicos, e diversas contraindicações importantes; consequentemente existe uma baixa adesão ao tratamento pelos pacientes (85). Os efeitos colaterais mais comuns do tratamento com nitroheterocíclicos são: dermatite, intolerância digestiva, polineurite, depressão na medula óssea e hepatite; tratamento com NFX também já foi associado a distúrbios no sistema nervoso (86). Surpreendentemente, quanto menor a idade do indivíduo tratado, menores são os efeitos adversos causados pelos medicamentos, ou seja, crianças e recém-nascidos toleram mais o tratamento (87). Estudos clínicos focados na farmacocinética do BZL em adultos e crianças concluíram que uma dosagem mais reduzida de composto no tratamento da doença de Chagas, em relação ao esquema de

dosagem atual, ainda mantém a mesma eficácia clínica, podendo amenizar os efeitos adversos do tratamento (88,89). A alta frequência e a intensidade dos efeitos colaterais são responsáveis pela interrupção do tratamento em mais de 30% dos pacientes chagásicos (90,91).

Portanto, a fim de se obter resultados satisfatórios com o tratamento etiológico da doença de Chagas com os fármacos atualmente disponíveis, deve-se levar em consideração a dose dos medicamentos, a idade do paciente, a fase da doença e a cepa infectante. A **tabela 1** resume as características gerais dos compostos que compõem a quimioterapia antichagásica atual.

Tabela 1. Fármacos atualmente disponíveis para tratamento etiológico da doença de Chagas e suas características.

Fármaco	Benznidazol	Nifurtimox
Estrutura química		
Eficácia na fase aguda	75-95% (92)	88-100% (80)
Eficácia na fase crônica	8-9% (84)	7-8% (80)
Principais efeitos colaterais	Hipersensibilidade, edema, dores musculares, depressão da medula óssea e polineuropatia periférica*	Náusea, vômito, anorexia, perda de peso e efeitos neurológicos**

Fonte: *(93); **(94). Estrutura química: adaptado de (71).

1.5. Triagem e desenvolvimento de novos fármacos para doença de Chagas

1.5.1. Avanços recentes na busca por agentes antichagásicos

A quimioterapia atual para doença de Chagas apresenta falhas terapêuticas - em especial na fase crônica -, efeitos adversos e contraindicações importantes, além de

susceptibilidade variável entre as diferentes cepas de *T. cruzi*; conseqüentemente, existe uma necessidade urgente do desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento das fases aguda e crônica da doença. No entanto, a doença de Chagas é considerada uma doença tropical negligenciada pela OMS, tanto no ponto de vista de política pública e condição socioeconômica da população afetada, como também em relação à pesquisa e desenvolvimento, ao envolvimento da indústria farmacêutica e aos interesses acadêmicos. Historicamente, a maior parte da pesquisa por novos fármacos e alvos moleculares em *T. cruzi* tem sido timidamente realizada em laboratórios acadêmicos de pequena escala (95); entre as classes de compostos mais explorados estavam aquelas inibidoras de vias e processos metabólicos importantes para a fisiologia celular do *T. cruzi*, como os processos envolvendo a biossíntese do ergosterol, a cisteíno-proteinase (cruzipaína), a tripanotiona, síntese proteica ou de purinas, entre outros (96,56). Alguns compostos que agem sobre estas vias foram farmacologicamente reposicionados e entraram na fase clínica contra a doença de Chagas entre os anos 1970 - 2005, tais como alopurinol, cetoconazol (KTL), itraconazol (ITL) e fluconazol (FCL); esses fármacos, no entanto, quando usadas em monoterapia, não obtiveram êxito no tratamento etiológico em humanos, (97-101). A quantidade de compostos com potencial antichagásico que foram descobertos e seguiram no processo de desenvolvimento neste período é relativamente baixa, considerando a urgência de um tratamento mais seguro e eficaz, muito provavelmente devido a pobre correlação entre os resultados obtidos *in vitro* com os revelados na fase pré-clínica ou clínica, fruto de metodologias e técnicas pouco sensíveis associadas ao conhecimento ainda insuficiente acerca do patógeno.

Na última década, programas governamentais, parcerias público-privadas, iniciativas não-governamentais e consórcios internacionais dirigiram grandes campanhas de prospecção de novos compostos contra doenças negligenciadas, inclusive a doença de Chagas; estas iniciativas foram alavancadas pelo avanço tecnológico e criação de novas ferramentas e metodologias mais robustas que permitiam a triagem de compostos em larga escala. Entre as iniciativas e consórcios que mais se destacam, estão o programa de descoberta de fármacos para doenças negligenciadas e otimização de compostos *lead* do *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DND); o consórcio *Chagas Drug Discovery* do Instituto Nacional de Saúde (NIH) dos EUA; e os consórcios A-

PARADISE, KINDRED, NMTrypl, PDE4NPD, associados ao *Seventh Framework Programme for Research and Technological Development* (FP7) da União Europeia. Todas as campanhas contaram com algum apoio e suporte financiamento de governos ou organizações filantrópicas, como DNDi, fundação Bill & Melinda Gates, Médicos sem Fronteiras, entre outros. Em relação à participação recente das indústrias farmacêuticas, a GlaxoSmithKline (GSK), Novartis, Eisai, Merck e Tres Cantos (*Open Lab Foundation*) são algumas das empresas que desenvolveram projetos dedicados a descoberta e/ou ao desenvolvimento de fármacos para doença de Chagas (95,96). A **figura 5** mostra um panorama geral do cenário da quimioterapia e da descoberta de fármacos para doença de Chagas atualmente, um histórico do tratamento no passado e as perspectivas para esta área.

Apesar dos avanços, nos últimos anos, alguns poucos compostos destacaram-se no *pipeline* de descoberta de fármacos antichagásicos, entre estes sobressaíram os compostos da classe triazólica, tal como o ravuconazol – RVL - (E1224/ Eisai) e o posaconazol – PSL – (Schering-plough), que inibem a biossíntese de ergosterol do parasita (102,103); a seção **1.6.3** abrange mais detalhadamente o desenvolvimento e uso destes compostos contra doença de Chagas.

Embora os compostos nitroheterocíclicos apresentem uma série de desvantagens terapêuticas na quimioterapia antichagásica atual (seção **1.4.2**), o interesse nesta classe ressurgiu com recentes avanços de compostos em outras tripanossomíases, como o uso do composto nitroimidazol fexinidazol, que tem elevado potencial terapêutico contra leishmaniose visceral e está em fase clínica para HAT (104,105). O fexinidazol apresentou boa atividade contra *T. cruzi in vitro* e *in vivo*, inclusive contra cepas resistentes ou parcialmente resistentes ao BZL (106); porém, durante estudos clínicos de fase II (NCT02498782) limitações associadas com tolerabilidade em concentrações mais elevadas impediram a continuidade dos testes na Bolívia. Contudo, o composto mostrou-se seguro quando administrado sob baixas e efetivas concentrações, portanto um segundo estudo clínico de prova de conceito (PoC) foi redesenhado com início de recrutamento iniciado em 2017, na Espanha (107). Na mesma linha de nitro compostos, uma série de nitro-triazólicos obteve alguns prósperos resultados, tanto *in vitro* como *in vivo* contra *T. cruzi* (108). Os avanços pré-clínicos do composto nitroimidazooxazina VL-

2098 contra leishmaniose visceral favoreceram a investigação desta série contra *T. cruzi*, rendendo a descoberta de diversos compostos nitroimidazólicos com potencial atividade antichagásica (109,110). Uma possível limitação do desenvolvimento de novos compostos nitroheterocíclicos está associada aos relatos de resistência natural e adquirida de *T. cruzi* a esta classe de compostos (seção 1.7), o que comprometeria o emprego de novos fármacos que atuam neste mesmo mecanismo de ação.

Uma outra classe de destaque são os inibidores irreversíveis da cruzipaína, como o composto vinilsulfona K-777 e seu análogo WRR-483, que obtiveram resultados preliminares promissores em testes *in vitro* e em modelos animais (111,112) mas também tiveram o desenvolvimento descontinuado devido a questões de tolerabilidade em baixas doses detectadas em cachorros e primatas não-humanos (113). O uso de inibidores reversíveis pode atenuar os efeitos adversos destes inibidores da cruzipaína; estudos realçam os compostos que utilizam o grupo nitrila como porção eletrofílica para formação de ligação covalente com a protease - chamados grupos *warheads* - (114–116). Durante os testes fenotípicos dos inibidores de cruzipaína, alguns compostos foram encontrados com potencial tripanocida, afetando outros alvos no parasita, porém sem atividade associada a cruzipaína; entre eles estão um análogo do K-777 e o TZH9 que parecem inibir a biossíntese de ergosterol (101,117,118).

O reposicionamento ou reutilização de fármacos (ou de compostos *leads*) vem ganhando interesse na busca de novas terapias para diversas doenças, inclusive para doença de Chagas. Este processo consta na nova utilização, em uma determinada doença, de um fármaco já aprovado clinicamente para o uso em outra doença. As principais vantagens desta abordagem são o pré-estabelecimento e otimização dos perfis farmacocinético de segurança em humanos, o que acelera consideravelmente o tempo de desenvolvimento da fármaco e, conseqüentemente, reduz os custos totais do processo (119–121). Com o avanço da tecnologia de triagem de compostos em alta vazão, diversas bibliotecas foram disponibilizadas contendo fármacos já aprovados clinicamente (ou em fase avançada de desenvolvimento) para serem testadas contra modelos de doenças distintas, inclusive a doença de Chagas. Diversas classes de fármacos foram encontradas com atividade promissora contra *T. cruzi*, que eram utilizadas em uma variedade de doenças, agindo sobre diferentes alvos terapêuticos. As

principais classes de fármacos encontradas nos anos mais recentes foram as histamínicas – azelastina e clemastina -, as relacionadas a sistema nervoso (ifenprodil, ziprasidona, mebeverina, paroxetina), as bloqueadoras de canal de cálcio (benidipina e amlodipina), antimalárica (pironaridina), anti-helmíntica (triclabendazol), hipocolesterolêmico (clofibrato), antileprosa (clofazimina) e até um fármaco utilizado para tratamento de disfunção erétil (tadalafila) (120,122–125). Apesar das vantagens supracitadas, existem algumas limitações desta abordagem, tais como efeitos adversos que podem surgir da otimização original do fármaco (que era focado em outra doença); além disso o fato de não existir um desenvolvimento específico direcionado para a nova doença pode distanciar o composto do perfil ideal estabelecido para essa doença/alvo (121).

A combinação de compostos também tem se mostrado uma estratégia propícia no desenvolvimento de fármacos contra *T. cruzi*. Quando dois ou mais compostos agem sobre alvos distintos no parasita (ou na célula hospedeira), a probabilidade do surgimento de resistência é reduzida, além disso, as doses utilizadas dos compostos combinados podem ser diminuídas, mitigando assim os efeitos colaterais indesejados (101). A abordagem é ainda mais conveniente quando são realizadas a combinações de fármacos já aprovados, o que pode encurtar etapas do desenvolvimento, chegando mais rapidamente nos estudos clínicos, como no caso do tratamento com o composto referência BZL combinada com inibidores da biossíntese de ergosterol. Um estudo clínico de fase II avaliou a associação do BZL com posaconazol (STOPCHAGAS – NCT01377480), constatou-se que o BZL é mais eficaz do que o posaconazol e que não houve vantagem terapêutica na combinação de fármacos quando comparada com o tratamento do BZL sozinho (126). Um estudo de fase I (DNDi-CH-E1224-002) foi realizado na Argentina para analisar os parâmetros farmacocinéticos do BZL e do ravuconazol (na forma de pró-fármaco fosravuconazol, E1224) separadamente e em combinação; os resultados apontaram a combinação como sendo segura para o tratamento. Outro teste clínico de fase II (NCT01489228) foi realizado onde foram comparados o tratamento com BZL com cinco regimes distintos de doses de ravuconazol (E1224) e placebo; o estudo concluiu que o BZL em monoterapia possui maior eficiência e eficácia, mesmo 12 meses após o tratamento, enquanto o E1224 apresentou efeito

supressivo transiente na eliminação do parasita (127). Um novo estudo de fase clínica II foi proposto (BENDITA - NCT03378661) para testar a combinação do BZL e ravuconazol em pacientes chagásicos crônicos indeterminados, o estudo ainda se encontra na etapa de recrutamento (128). Além dos estudos em fase clínica, avanços recentes em ensaios pré-clínicos apontam para tratamentos com compostos alternativos em combinação contra *T. cruzi*, como no caso do tratamento utilizando arilimidamidas combinadas com BZL, que resultou numa redução significativa da carga parasitária (quando comparado com a monoterapia), além da eliminação de efeitos adversos (129). Um outro estudo em modelo animal demonstrou que a curcumina potencializa a ação antiparasitária do BZL, quando usados em combinação, também foi observada a atenuação dos efeitos hepatotóxicos associados ao uso de BZL e a prevenção da recrudescência em animais não curados (130). Já em relação a outros fármacos aprovados, os tratamentos em combinação do antidepressivo clomipramina e do hipocolesterolêmico fenofibrato com o BZL mostraram-se favoráveis, já que para ambos os compostos combinados com BZL houve uma redução da carga parasitária e dos danos cardíacos em camundongos submetidos a estas terapias (131,132).

Apesar dos avanços na prospecção de compostos com atividade antichagásica em potencial e na progressão de estudos clínicos com tratamentos alternativos aos atualmente utilizados, não existe, até a presente data, nenhum composto, vacina ou novo tratamento que substitua os fármacos clinicamente aprovados. Neste sentido, é necessário que as campanhas de triagem de compostos e as iniciativas de busca por tratamentos alternativos para a doença de Chagas continuem ativas, utilizando metodologias e modelos experimentais mais robustos e fidedignos que possam alcançar melhor reprodutibilidade em pacientes. No **anexo III** consta um artigo de revisão escrito por nós onde descrevemos com mais detalhes os aspectos atuais do desenvolvimento de fármacos contra a doença de Chagas, além de um levantamento das estratégias utilizadas até então. Uma das abordagens que mais impulsionou a descoberta de novas moléculas com potencial antichagásico foi a introdução da triagem de alta vazão (*High throughput screening* - HTS-) no processo de desenvolvimento de fármacos para doenças negligenciadas; dada que as pujantes ferramentas tecnológicas que compõem as plataformas de HTS, utilizadas primordialmente em indústrias farmacêuticas,

ganharam acesso em laboratórios acadêmicos, centros de pesquisa biomédica e pequenas empresas de biotecnologia.

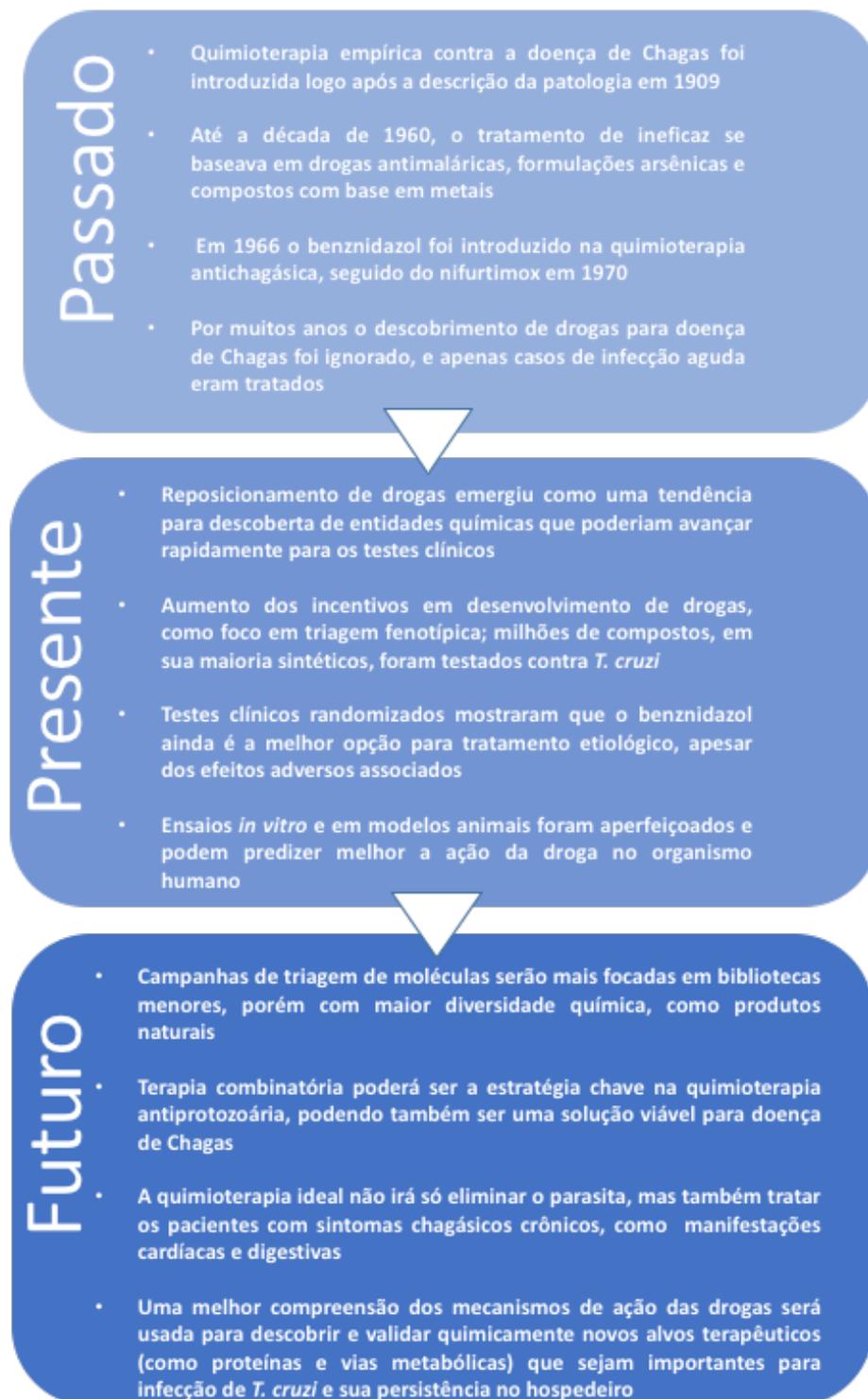


Figura 5. Panorama com histórico, as principais tendências e perspectivas no descobrimento e desenvolvimento de fármacos para doença de Chagas. Adaptado de (95).

1.5.2. Triagem de compostos em alta vazão (HTS) e ensaios fenotípicos

A estratégia de HTS, na qual extensas bibliotecas de amostras ou compostos são testadas contra uma célula inteira ou contra estruturas específicas isoladas, possibilita a avaliação de atividade de candidatos a fármacos em larga escala com redução significativa de tempo e custos (133,134). Uma vantagem do ensaio de HTS baseado em ensaios fenotípicos, também conhecido como triagem de alto conteúdo (*High content screening* - HCS), é que a abordagem não depende de uma validação prévia de alvos, o que acelera consideravelmente o processo e amplia a possibilidade de descoberta de moléculas que agem em possíveis alvos ou vias ainda não descritos ou que possuem um padrão de inibição múltipla sobre as complexas interações celulares (por exemplo a relação entre o parasita e a célula hospedeira). Deste modo, reduz-se os riscos de futuras falhas com os compostos devido à baixa equivalência entre promissores alvos isolados em modelos experimentais para a doença real. Adicionalmente, o sistema de HCS fornece uma indicação prévia de características toxicológicas e alterações morfológicas das amostras triadas sobre as células hospedeiras por meio de avaliações visuais conclusivas e irrefutáveis, enquanto testes complementares são necessários quando se realizam ensaios enzimáticos baseados em alvo ou outros ensaios do tipo *cell-free*. Houve um aumento significativo na contribuição de ensaios fenotípicos para programas de descoberta de fármacos nas últimas décadas, dado que o uso desta abordagem independe de estruturas moleculares previamente elucidadas, há uma maior probabilidade de encontrar compostos que agem sobre novos alvos e que, portanto, podem se tornar fármacos *first-in-class* - moléculas farmacêuticas com um mecanismo inédito para tratar uma doença - (135).

No caso da doença de Chagas e outras doenças tropicais negligenciadas, como há opções de tratamento limitadas e poucos alvos validados disponíveis, os ensaios fenotípicos podem contribuir muito para a descoberta de novos medicamentos (95). Considerando que se pode reproduzir todas as etapas do ciclo de vida do *T. cruzi in vitro*, e que este parasita é promíscuo em relação ao tipo de célula hospedeira, o modelo de HCS torna-se uma ferramenta tecnológica prática tanto para estudar interações parasito-hospedeiro e aspectos da biologia básica deste organismo, como na triagem de

compostos com potencial antichagásico (136). Os ensaios de viabilidade contra parasitas que usam o sistema HCS destacam-se pois permitem a seleção de compostos que são capazes de exercer atividade antiparasitária no meio celular, enquanto que as abordagens baseadas em alvo muitas vezes exigem triagens secundárias para confirmar que os compostos de interesse possuem, de fato, atividade contra o parasita vivo (137). Ademais, os compostos anti-*T. cruzi* encontrados num ensaio contra o amastigota intracelular têm a vantagem de já possuírem a característica de permeabilidade celular e de agirem sobre algum alvo/via essencial neste ambiente parasita-hospedeiro, apesar de desconhecido (138). A metodologia HCS é baseada no imageamento automatizado do sistema biológico seguido da extração, processamento, e análise de dados por *softwares* específicos. Esta configuração permite sistemáticas avaliações qualitativas e quantitativas sobre diversos fenômenos celulares. Entre as principais limitações da abordagem de HCS estão: a necessidade de armazenamento e gestão de um extenso volume de dados e velocidade de aquisição e análise relativamente baixas, quando comparado com ensaios de viabilidade realizados por equipamentos de leituras rápidas, como luminescência e calorimetria (139). Considerando ainda a complexidade da resposta mediada por *stress* celular e a maior sensibilidade de micro oscilações ambientais, os ensaios fenotípicos com abordagem HCS tendem a apresentar menor reprodutibilidade quando comparados com ensaios baseados em alvo. Apesar destas limitações, os ensaios do tipo HCS dispõem das ferramentas mais avançadas e precisas para acessar atividade de compostos contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*. Quando o método de análise de imagem é bem validado, não se observa qualquer diferença estatisticamente relevante entre a inspeção manual convencional e a quantificação automatizada de células infectadas em ensaios baseados em imagens (140), sendo que a segunda apresenta vantagens como imparcialidade e alto rendimento, quando comparado com o operador humano.

Diversos ensaios de triagem de compostos já foram desenvolvidos contra amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, a **tabela 2** resume as principais publicações destes ensaios, ressaltando as peculiaridades de cada um, tal qual o tipo de abordagem, a célula hospedeira utilizada, a cepa de *T. cruzi* e os destaques da técnica. Algumas metodologias de HCS utilizam *softwares* com algoritmos proprietários, outras adaptam programas

comerciais para definir os parâmetros de segmentação a partir do sinal de fluorescência da imagem microscópica de alta resolução e por fim, delimitar e quantificar as células hospedeiras infectadas com amastigotas de *T. cruzi* (141). A maioria destes ensaios avalia a ação dos compostos contra apenas uma cepa de *T. cruzi* em apenas um modelo de célula hospedeira, entretanto a flexibilidade do ensaio HCS favorece a utilização de quaisquer cepas dos diferentes DTUs, incluindo isolados clínicos recentes, além de permitir o uso amplo de células hospedeiras (32,142). A dinâmica de uma célula hospedeira e suas específicas interações com o parasita podem ser influenciadas pelas diversas cepas e isolados utilizados nos ensaios (143,144). Sabe-se que os diferentes tipos de linhagem celular que são infectadas pelo *T. cruzi*, por apresentarem diversidade morfológica, fisiológica e estrutural, influenciam de maneira distinta as funções celulares nas interações parasito-hospedeiro: desde o processo de reconhecimento, invasão, formação do vacúolo intracelular, replicação e lise. O perfil de infecção e replicação do *T. cruzi* pode apresentar grande variação em diferentes células hospedeiras (145) podendo afetar também na atividade de diferentes compostos promissores, que agem não só sobre alvos no parasita, como também atuam sobre as vias da célula hospedeira (146,147). Levando em consideração todas peculiaridades das cepas distintas de *T. cruzi*, a interação com diferentes linhagens celulares e o possível impacto dessa variabilidade nos ensaios de prospecção de compostos, a comparação de resultados utilizando células e cepas distintas é questionável; deve-se, portanto, estudar o impacto do uso de diferentes células hospedeiras e cepas nos ensaios fenotípicos de descoberta de fármacos contra *T. cruzi*.

Considerando a complexidade de reproduzir a doença de Chagas experimentalmente, é essencial a padronização de etapas biologicamente relevantes em estudos pré-clínicos a fim de prosseguir com moléculas potenciais em ensaios clínicos (148). Neste contexto, os testes *in vitro* devem abordar os mais diversos fatores representativos da doença, e que estas avaliações múltiplas permitam definir com mais precisão os vários aspectos das interações entre o composto, o parasita e as diferentes células hospedeiras (149). De acordo com o DNDi, deve ser dada prioridade a uma abordagem robusta, de alta sensibilidade e reprodutibilidade na descoberta de fármacos contra a doença de Chagas; além disso se recomenda que um composto promissor deve

ser eficaz em todas as regiões endêmicas da doença, ou seja, contra cepas distintas do *T. cruzi* (150).

Tabela 2. Diferentes protocolos de ensaios desenvolvidos para triagem de fármacos contra *T. cruzi* e suas principais características.

Ensaio	Pontos relevantes	Cepa de <i>T. cruzi</i>	Célula hospedeira	Autor
	Primeira triagem de média vazão utilizando <i>T. cruzi</i> transgênico em placas de 96 poços.			(151)
<i>T. cruzi</i> expressando β-galactosidase (colorimétrico)	Tempo de ensaio mais curto e com foco em ambas as formas tripomastigota e amastigota.			(152)
	Triagem em larga escala (> 300.000 compostos) e teste confirmatório usando imunofluorescência.	Tulahuen C4 (TcVI)	3T3	(138)
	Triagem de uma coleção de compostos da GSK com 1,8 milhão de compostos em placas de 1.536 poços.			(153)
Ensaio baseado em imagem	Desenvolvimento e validação de um ensaio baseado em imagem utilizando <i>software</i> de processamento de imagens comercial (IN Cell Workstation).	CA-I/72 (Tcl)	BESM	(149)

Tabela 3. Continuação

Ensaio	Pontos relevantes	Cepa de <i>T. cruzi</i>	Célula hospedeira	Autor
	Uso de parasitas geneticamente modificados expressando proteína fluorescente.	CL TdTomato (TcVI)	Vero	(154)
	Validou a contagem automatizada com a contagem manual.	Y (TcII)	3T3	(140)
Ensaio baseado em imagem	Uso de um algoritmo personalizado para processamento e análise de imagens desenvolvido para HTS em <i>T. cruzi</i> .	CA-I/72 (Tcl)	U2OS	(155)
	Uso de <i>software</i> comercial Acapella e análise da detecção de artefato.	Tulahuen C4 (TcVI)	H9c2	(156)
	Comparação entre os resultados obtidos pelos métodos colorimétricos (β -galactosidade) e baseado em imagem pelo software Harmony.	Tulahuen (TcVI)	3T3	(157)
	Foram testados 700.000 compostos num modelo otimizado de parasitas infectando células cardíacas imortalizadas.	CA-I/72 (Tcl)	C2C12	(158)
	Num modelo de descoberta de <i>hits</i> em cascata, além de testar bibliotecas de compostos aprovados, verificava a cinética de morte e desprivilegiava os inibidores de CYP51.	Sylvio X10/7 A1 (Tcl)	Vero	(123)

1.6. Alvos de agentes quimioterápicos contra *T. cruzi*

1.6.1. Vias metabólicas e biologia celular de *T. cruzi*: foco em alvos terapêuticos

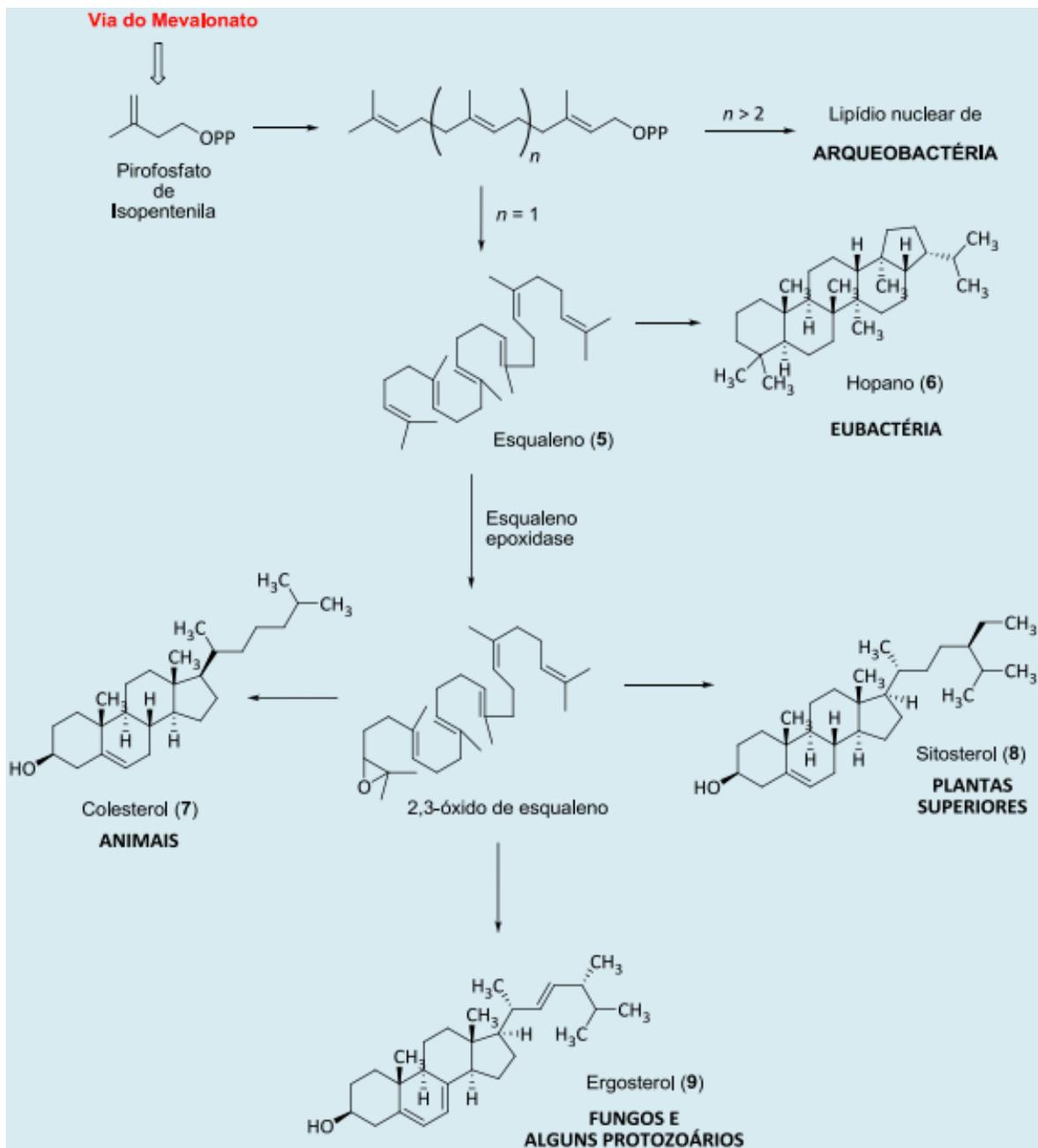
Quando realizados de maneira racional e focados em alvo, os processos de triagem e desenvolvimento de novos compostos anti-*T. cruzi* buscam vias bioquímicas, estruturas celulares, organelas e moléculas essenciais para o parasita e que, preferencialmente, não ocorram nas células do hospedeiro humano. Algumas estruturas e organelas celulares diferenciadas em tripanossomatídeos são o cinetoplasto e seu material genético, assim como os mecanismos de replicação que envolvem essa estrutura exclusiva dos kinetoplastídeos; o flagelo e a região da bolsa flagelar; a mitocôndria única que ocupa grande volume citosólico; distintos lipídeos de membrana; os glicosossomos, que são associados a glicólise, beta-oxidação de ácidos graxos, síntese de éter lipídico e recuperação de nucleotídeos; os reservossomos, que são exclusivos da fase epimastigota; os acidocalcissomos, organelas ácidas associadas com regulação de pH, controle osmótico, homeostase de cálcio e armazenamento de cátions e fósforo; entre outras (159–161). Estas organelas têm papel essencial na sobrevivência do parasita, em pelo menos algum estágio do ciclo de vida do *T. cruzi*, além de não ocorrerem em células de mamíferos, o que as torna alvos promissores para um potencial tratamento (162).

Técnicas moleculares, como sequenciamento genômico, perfil proteômico e tecnologia de RNA de interferência (RNAi) auxiliaram na descoberta de genes e proteínas essenciais tanto para o metabolismo intrínseco do parasita, como aqueles importantes para manutenção e desenvolvimento, mas associados a célula hospedeira (163,164)

Estudos de bioquímicos e moleculares de *T. cruzi* já identificaram e validaram diversos candidatos como alvos potenciais para quimioterapia da doença de Chagas; algumas destas rotas bioquímicas já foram amplamente investigadas, como a proteólise mediada por cruzipaina, metabolismo do pirofosfato, da transferência do ácido siálico, via glicolítica, as DNA topoisomerasas, desacetilases, as vias enzimáticas da nitrorredutase tipo I, da recuperação de purinas, mecanismo dependente de tióis, da tripanotoma

sintase e redutase, e uma das vias mais promissoras, a via de biossíntese de ergosterol (165-172).

O ergosterol é o esterol usado pelo *T. cruzi* como constituinte de sua membrana celular, sendo essencial para seu desenvolvimento, funcionamento da membrana plasmática e manutenção da integridade celular; este parasita é metabolicamente incapaz de sequestrar e processar o colesterol abundante nas células hospedeiras dos mamíferos, por isso é necessária a síntese *de novo* a partir de rotas bioquímicas próprias (102). A rota biossintética do ergosterol é composta por mais de 20 etapas bioquímicas (**esquema 1**), envolvendo enzimas específicas em protozoários e fungos, estas são ausentes em células de mamíferos e, portanto, sua inibição pode interferir no crescimento destes patógenos sem causar efeitos severos nas células hospedeiras. Enzimas envolvidas nessa rota do metabolismo de esteróis já foram estudadas como potenciais alvos para fármacos por mais de 20 anos (101,173).



Esquema 1. A via de biotransformação de esteróis em diferentes seres vivos. Partindo da mesma estrutura molecular comum, enzimas particulares de cada classe de ser vivo (de arqueobactéria a animais superiores) fazem a biotransformação específica nas moléculas esteróis finais. Fonte: (174).

1.6.2. Lanosterol 14- α desmetilase (CYP51)

A proteína mais estudada da via de biossíntese de ergosterol em *T. cruzi* é a lanosterol 14- α desmetilase (CYP51), uma CYP monooxigenase funcionalmente conservada do complexo de superfamília das hemoproteínas do citocromo P-450. Esta enzima está essencialmente envolvida em uma reação catalítica em três etapas, onde ocorre a desmetilação do lanosterol no carbono de posição 14; esta é a primeira etapa pós-ciclização na via biossintética dos esteróis, levando a formação do substrato inicial para a formação do ergosterol, no caso das células de alguns protozoários. A desmetilação é realizada pela sexta posição de coordenação do ferro do centro heme, que normalmente está ligado à água na enzima inativa (175).

As metaloenzimas CYP são encontradas em organismos de todos os reinos biológicos, apesar da identidade geral de aminoácidos de apenas 22% (176). Um estudo cristalográfico feito na CYP51 de *T. brucei* demonstrou que sobre o plano do centro heme (na sexta posição de coordenação do sítio), a cavidade do sítio ativo é rodeada pelas estruturas: B'-hélices por cima, α -hélice I pela direita, β -*bundle* 1 pela esquerda, um *loop* k- β 1-4 por baixo e hélice F/ β 4-*hairpin* na superfície frontal (**figura 6**). A α -hélice I está seguramente envolvida na atividade da enzima: os resíduos conservados da hélice, particularmente Ala291 e Thr295, estabilizam a posição do esqueleto de carbono do citocromo por interações hidrofóbicas. Aparentemente existe um papel importante na cadeia lateral da Gln293 em relação a interação com hélice E. Outras características envolvendo o sítio ativo também são importantes: coordenação 5 do Cys422 (conectando α - η K) com o ferro do heme suporta a posição oposta 6, enquanto um suporte adicional ao citocromo é dado por ligações de hidrogênio a uma cadeia lateral dicarboxílica de Arg361 (β 1-4), a nitrogênios de cadeias laterais, a outros dicarboxilatos do anel de nitrogênio da His420 (em α - η K) e a hidroxila da cadeia lateral Tyr116 (em α - η B'') (177). Em *T. cruzi*, algumas cepas apresentam uma única cópia do gene da CYP51 (por exemplo, as cepas Sylvio, Marikellei), enquanto outras possuem duas cópias (por exemplo, as cepas Y, CL Brener e Colombiana); além disso, variações nas sequências

da proteína podem chegar a diferença de 16 aminoácidos entre as cepas (Y x Marinkellei) (178).

Considerando que a via biossintética dos esteróis ocorre em uma variedade de espécies, incluindo fungos e animais, diversos inibidores de esteróis foram prospectados apresentando atividade em potencial contra vários patógenos de importância clínica (179); muitos desses inibidores foram então reposicionados como compostos anti-*T. cruzi* e obtiveram êxito em muitas etapas do desenvolvimento de fármacos para doença de Chagas (180).

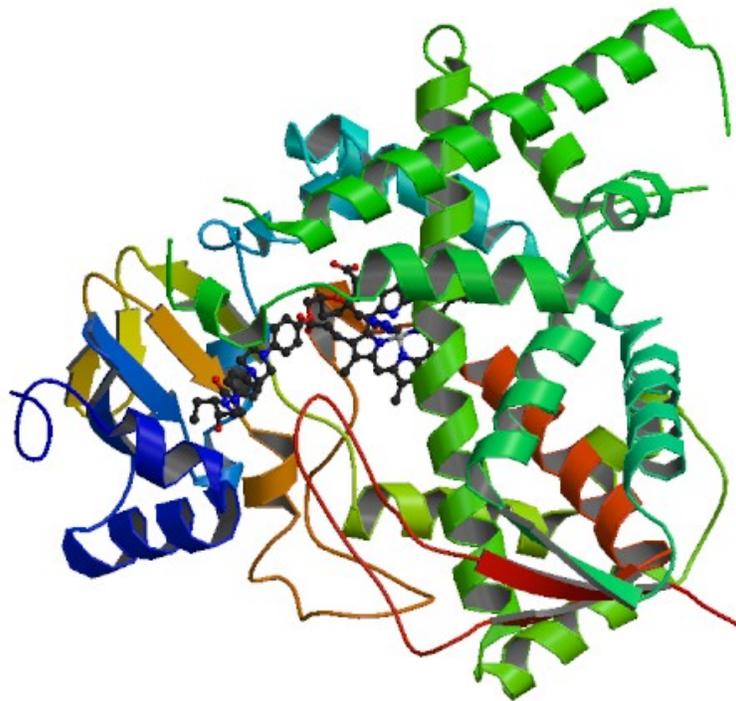


Figura 6. Modelo da estrutura cristalográfica da TcCYP51 complexada com o composto posaconazol.
Fonte PDB:3K1O (doi:10.2210/pdb3K1O/pdb)

1.6.3. Inibidores azólicos e não-azólicos da TcCYP51

Os compostos que inibem a TcCYP51 geralmente agem contra a enzima por coordenação com o átomo de ferro do grupamento heme da enzima (a partir da interação de um dos nitrogênios do anel azol, no caso dos compostos azólicos). Esta interação

exerce um impedimento alostérico da interação do sítio ativo com o substrato alvo, impedindo a conversão catalítica (181). Os principais compostos inibidores da CYP51 e suas respectivas estruturas químicas estão exibidos no **esquema 2**.

Mostrou-se que os inibidores da biossíntese de ergosterol induzem alterações significativas na ultraestrutura de diversas organelas do *T. cruzi*, essas alterações ocorrem principalmente no complexo cinetoplasto-mitocôndria, retículo endoplasmático, complexo de Golgi, inclusões lipídicas, membrana plasmática e flagelo (182–185). Também foi constatado um acúmulo de gotículas de natureza lipídica após o tratamento com inibidores da biossíntese de ergosterol (186), sugerindo que são reservas aglomeradas de substâncias precursoras da produção do ergosterol.

O primeiro fármaco da classe dos inibidores de CYP51 a ser descrita com atividade contra *T. cruzi* foi o miconazol, um antifúngico derivado do imidazol de primeira geração. Este composto, juntamente com seu análogo econazol, foram capazes de inibir o crescimento de *T. cruzi* agindo sobre a via de biossíntese do ergosterol (187); entretanto, estes compostos apresentam baixa biodisponibilidade oral (geralmente são usados em aplicações tópicas em infecções fúngicas), portanto são limitados no uso de terapia antichagásica (188). O cetozonazol também apresentou boa atividade contra a CYP51, e inibiu a proliferação de *T. cruzi* em modelos *in vitro* e *in vivo* (189); porém, a avaliação em modelo murino de fase crônica revelou falha terapêutica (190).

A partir de uma iniciativa para otimização farmacocinética de compostos antifúngicos, foram desenvolvidos os compostos triazólicos de primeira geração; com a substituição do núcleo imidazol pelo triazol, os compostos apresentavam-se metabolicamente mais estáveis e com maior especificidade com a CYP51 (188). O fluconazol é um triazol que apresentou uma promissora atividade anti-*T. cruzi in vitro*, mas posteriormente falhou nos testes em modelo animal; além disso a rápida indução de resistência *in vitro* foi constatada para este composto (191,192). Um perfil semelhante pode ser notado para o triazol itraconazol: uma atividade satisfatória contra *T. cruzi, in vitro*, mas sem nenhum efeito benéfico no tratamento de pacientes com infecção crônica da doença (193).

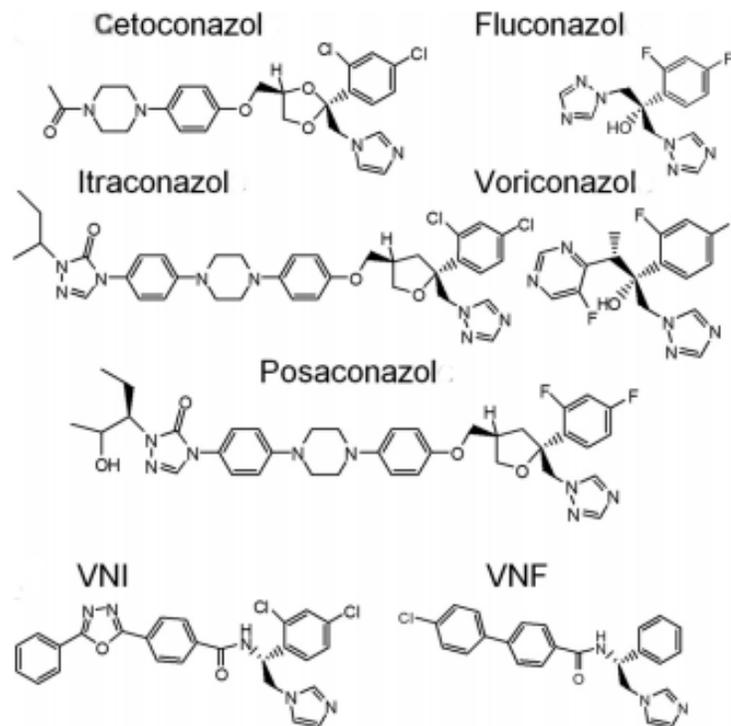
Com intuito de melhorar a biodisponibilidade e o tempo de meia vida dos fármacos, os triazólicos de segunda geração foram desenvolvidos a partir do esqueleto do

fluconazol. O voriconazol foi o primeiro fármaco eficaz utilizado para o tratamento de micoses sistêmicas invasivas, por outro lado, seu desempenho *in vitro* contra *T. cruzi* foi inferior aos demais compostos azólicos (194); apesar do baixo desempenho relatado *in vitro*, estudos mais recentes em modelos animais destacaram a atividade do composto como potencial alternativa na quimioterapia antichagásica (195).

O posaconazol também é um triazólico de segunda geração lançado para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, mas este foi desenvolvido a partir da estrutura do itraconazol (e não do fluconazol), este composto apresentou um excelente perfil de atividade contra o *T. cruzi*, inclusive em modelos de infecção crônica da doença de Chagas em modelo murino e posteriormente avançando para fase de estudos clínicos – ver seção **1.4.3** (103,196). Um outro composto triazol de segunda geração promissor é o ravuconazol; com um tempo de meia-vida superior em humanos e um volume relativamente grande de distribuição sistêmica, este composto antifúngico destacou-se nos programas de desenvolvimento de fármacos como possível agente contra doença de Chagas (102,197). Outros compostos triazólicos de segunda geração também mostraram-se eficazes em modelos experimentais da doença de Chagas, como o albaconazol, o D0870 e o TAK-187 (198–200); entretanto existem poucas informações sobre farmacocinética e segurança destes compostos, dado que ainda não foram aprovados clinicamente.

Alguns compostos não-azólicos também mostraram atividade promitentes contra *T. cruzi*, como os análogos do antineoplásico experimental tipifarnibe (originalmente inibidor da farnesil-transferase), que foram modificados racionalmente para aumentar a especificidade contra a CYP51 (201). Outros dois compostos não-azólicos que obtiveram atividade favoráveis no tratamento experimental contra *T. cruzi* são o VNI e seu derivado VNF (202). O VNI não apresentou toxicidade ou mutagenicidade, pode ser administrado via oral e possui um perfil farmacocinético favorável para um candidato a fármaco contra doença de Chagas (203). Em uma análise de inibição comparativa com azóis, dois compostos derivados de piridina - UDO (EPL-BS1246) e UDD (EPL-BS0967) – mostraram-se mais seletivos que os compostos azólicos com resultados de inibição potente da TcCYP51 (204).

Mesmo diante de tantos compostos com atividade comprovada contra *T. cruzi*, os dois fármacos que mais se destacaram e avançaram na plataforma de descoberta de novas moléculas foram o ravuconazol (sob sua forma de pró-fármaco E1224) e o posaconazol. Ambos foram testados em estudos clínicos, contudo um alto nível de falha terapêutica foi constatado para o ravuconazol (80% de recrudescência em pacientes tratados) e para o posaconazol (85,205), possivelmente devido a eficácia insuficiente conforme estudos subsequentes demonstraram em modelos *in vitro* e *in vivo* (206-208).



Esquema 2. (página anterior) Principais Inibidores de CYP51 utilizados como anti-*T. cruzi*. Cetoconazol é um azólico utilizado em tratamento antifúngico; fluconazol e itraconazol pertencem a classe da primeira geração de triazóis; voriconazol, posaconazol e ravuconazol (não mostrado) representam os triazóis de segunda geração e os compostos VNI e VNF são inibidores não-azóis de CYP51. Adaptado de (177).

1.7. Resistência a fármacos em *T. cruzi*

Assim como todos os tratamentos medicamentosos para doenças infecciosas usados clinicamente, a quimioterapia atual da doença de Chagas está sujeita ao perigo do surgimento de resistência. A ocorrência da resistência a compostos referência, como BZL e NFX, já foi descrito em *T. cruzi* (e em outros tripanosomatídeos) (68,209,210), apesar disso, o processo de resistência ainda é pouco compreendido, exigindo estudos mais elucidativos. Diversos genes de *T. cruzi* estão associados à resistência aos compostos nitroheterocíclicos; em relação à resistência ao BZL, vários genes foram descritos como importantes para este processo, entre eles estão o da superóxido dismutase (TcFeSOD-A), da triparedoxina peroxidase, da nitrorredutase tipo I (TcNTR-1), das aldo-cetoreduases (TcAKR), de cassete transportador ligado a ATP (TcABCG1), da prostaglandina F₂α sintase, entre outros (211–216). Alguns destes genes também estão associados com resistência cruzada ao NFX, como caso do NTR-1, cuja perda de um único alelo provoca a resistência contra ambos os compostos (68); estas observações de resistência cruzada ressaltam a desvantagem do uso de medicamentos referência com mecanismos de ação semelhantes.

Além disso, estudos demonstraram, através de testes *in vitro* e *in vivo*, a ocorrência de resistência natural de algumas cepas de *T. cruzi* aos fármacos atualmente utilizadas no tratamento da doença de Chagas (217–219). Esta resistência natural ao NFX e BZL parece estar associada a clones de *T. cruzi* isolados de animais selvagens ou insetos vetores (56). Recentemente foi demonstrada a variabilidade da susceptibilidade a compostos inibidores da via de biossíntese de ergosterol entre diferentes cepas pertencentes a cada um dos DTUs, enquanto os compostos nitroheterocíclicos mostraram-se mais eficazes na eliminação de amastigotas intracelulares destas mesmas cepas, *in vitro* (206). Também foi verificada uma variação na susceptibilidade de diferentes cepas de *T. cruzi* ao composto alopurinol (220). Ademais, diferenças em números de cópias de genes e no padrão de expressão de proteínas essenciais entre os DTUs podem levar a variações de inibição das moléculas alvos por compostos promissores. Mutações em resíduos específicos em alvos proteicos também levam a resistência a certos compostos; um exemplo foi a detecção da alteração de uma prolina

para serina (P355S) na TcCYP51, associada com alteração na inibição de fármacos que agiam sobre esta enzima (178).

Adicionalmente, estudos de seleção *in vitro* de clones resistentes a BZL comprovaram que os metabólitos gerados pelo composto induzem acúmulo de mutações relacionadas com multirresistência a fármacos (MDR), dado que os clones resistentes ao BZL também se tornaram resistentes ao NFX, posaconazol e sulfona de fexinidazol (221). Logo, estudos confirmatórios que demonstram o rápido desenvolvimento de resistência a fármacos *in vitro* podem servir como modelos preditivos para este fenômeno, que tem potencial para ocorrer durante a quimioterapia da doença de Chagas (192). Além disso, a caracterização fenotípica e genotípica de clones resistentes a fármacos pode auxiliar na compreensão dos mecanismos de interação com o alvo molecular do composto. Também é válido ressaltar que devido às dissimilaridades entre as diferentes cepas de *T. cruzi* em relação a sensibilidade às fármacos, a aprovação de novos compostos antichagásicos deve considerar o teste em um painel de cepas distintas durante a fase inicial de desenvolvimento de fármacos (222).

Existe uma falta de correspondência evidente entre os promissores resultados obtidos durante a fase pré-clínica e as falhas frustrantes constatadas no ensaio clínico (96); somado a isso, os conhecimentos limitados de mecanismos de tolerância e resistência do *T. cruzi* aos compostos, e de como isso pode alterar a sua biologia requerem estudos mais aprofundados das interações entre os fármacos e o alvo no parasita. A resistência aos compostos triazólicos pode ser induzida *in vitro*, sob pressão constante do fármaco na cultura do parasita (192); neste sentido, o estudo do desenvolvimento de resistência ao ravuconazol é um bom modelo experimental já que o alvo molecular do composto e sua via já são conhecidos. Deste modo, os mecanismos de resistência e alterações biológicas podem ser elucidados ao correlacionar os eventos constatados no perfil fenotípico (padrões de crescimento e diferenciação e perfil de resposta a diferentes compostos) com comparações de sequenciamento do DNA destes estoques em relação ao clone parental e predição de possíveis alterações estruturais na TcCYP51, se constatadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento, padronização e execução de um ensaio baseado em imagem para prospecção de compostos contra *T. cruzi*. A triagem de compostos proposta visou a seleção de um potencial candidato antichagásico de amplo espectro de atividade contra o maior número possível de cepas de *T. cruzi* e contra diversas linhagens de célula hospedeira infectadas, com seletividade, potência e eficácia satisfatórias. O ensaio fenotípico desenvolvido também serviu de base para investigar o perfil fenotípico de um parasita resistente ao composto triazol ravuconazol, em comparação com o parasita parental; estudos sobre o mecanismo molecular de resistência ao composto também foram conduzidos através de análises genômicas e predição de alteração estrutural da enzima alvo.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Desenvolver e validar um ensaio baseado em imagem para triagem de compostos contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*;
- 2) Verificar impacto da escolha da linhagem celular nos ensaios fenotípicos de prospecção de fármacos antichagásicos;
- 3) Confirmar atividade dos compostos selecionados em ensaios com doses múltiplas para determinação de concentração efetiva, atividade máxima, concentração citotóxica e índice de seletividade;
- 4) Testar os compostos selecionados contra um painel de cepas de *T. cruzi*;
- 5) Verificar o efeito dos compostos selecionados em combinação com fármacos referência;

- 6) Triar uma biblioteca de compostos contra três cepas distintas de *T. cruzi* para avaliar a variabilidade da triagem de compostos com cepas distintas e selecionar compostos com maior espectro de atividade;
- 7) Caracterizar fenotipicamente o clone de *T. cruzi* resistente ao composto ravuconazol;
- 8) Testar outros compostos (inibidores ou não da TcCYP51) para traçar o perfil da resistência do clone em relação ao clone parental;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Células de mamíferos

3.1.1. L6

Esta linhagem celular miogênica foi isolada de cultura de células musculares primárias de rato (*Rattus norvegicus*). O estoque desta linhagem foi originalmente obtido do Banco de Células do Japão (JCRB – Ibaraki, Japão). Células L6 apresentam características morfológicas de mioblastos aderentes; estas células podem formar em cultura, por fusão, miotubos multinucleados e fibras estriadas. Esta linhagem foi mantida em meio DMEM com alta glicose (Hyclone), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS – Gibco) e uma solução antibiótica com 100 U/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina (*pen-strep* - Gibco). Este meio é aqui abreviado por meio DMEM. As células foram tripsinizadas (solução de tripsina 0,05% - EDTA - Gibco) a cada 3 dias e semeadas na densidade de $1,0 \times 10^4$ células/mL, em 25 mL, no frasco de cultura T175 (Sarstedt). A passagem máxima utilizada para esta linhagem foi de 15.

3.1.2. LLC-MK₂

A linhagem celular LLC-MK₂ foi isolada de uma suspensão celular preparada a partir de rins removidos do macaco *Rhesus* (*Macaca mulatta*). O estoque utilizado neste ensaio foi cedido por S. Schenkman (Universidade Federal de São Paulo – São Paulo, Brasil). Esta linhagem celular foi mantida em o meio DMEM *high*. As células foram

tripsinizadas (solução de tripsina 0,05% - EDTA - Gibco) a cada 3 – 4 dias e semeadas na densidade de 4×10^4 células/mL, em 25 mL, no frasco de cultura T175 (Sarstedt). A passagem máxima utilizada para esta linhagem foi de 20.

3.1.3. THP-1

A linhagem THP-1 foi obtida a partir do sangue periférico de um paciente humano de 1 ano de idade com leucemia monocítica aguda. O estoque foi obtido do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – Xerém, Brasil) (BCRJ0234). As células THP-1 são monocíticas e, quando induzidas com 50 ng/mL de éster de forbol (PMA, Sigma-Aldrich), diferenciam-se em células do tipo macrófago (*macrophage-like cell*). Esta linhagem celular foi mantida em meio RPMI-1640 suplementado com 20% (v/v) de FBS (Gibco) e *pen-strep* (Gibco) – aqui abreviado por meio RPMI. Células foram semeadas a cada 3 -4 dias em T175 (Sarstedt), na densidade de 2×10^5 células/mL, em 25 mL, e mantidas sob crescimento exponencial por no máximo 10 passagens.

Para realizar a triagem da biblioteca LOPAC, onde todas as células foram utilizadas como hospedeiras no ensaio primário (exceto pela LLC-MK₂), as células foram submetidas as mesmas condições de cultivo da THP-1, com intuito de homogeneizar o meio de cultura utilizado no cultivo e no ensaio. Ou seja, o meio RPMI foi utilizado tanto para o crescimento e cultivo prévio das linhagens celulares, como também foi o meio empregado na diluição das células e parasitas na placa de ensaio.

3.1.4. U2OS

A linhagem celular U2OS originou-se do tecido ósseo de uma paciente humana de 15 anos com osteossarcoma. O estoque foi obtido do BCRJ (BCRJ0304). Células U2OS exibem morfologia de célula epitelial aderente. Esta linhagem celular foi mantida sob o meio DMEM *high*. As células foram tripsinizadas (solução de tripsina 0,05% - EDTA - Gibco) a cada 4 dias e semeadas na densidade de 8×10^4 células/mL, em 25 mL, no frasco de cultura T175 (Sarstedt). A passagem máxima utilizada para esta linhagem foi de 15.

3.1.5. VERO

Assim como a LLC-MK₂, a célula VERO também foi originalmente isolada de rins de macaco, porém a espécie *Cercopithecus aethiops*. O estoque usado neste trabalho foi cedido por A. Tanuri (Universidade Federal do Rio de Janeiro - Rio de Janeiro, Brasil). Estas células foram mantidas em meio DMEM *high* e tripsinizadas (solução de tripsina 0,05% - EDTA - Gibco) a cada 3 – 4 dias e semeadas na densidade de 4x10⁴ células/mL, em 25 mL, no frasco de cultura T175 (Sarstedt). A passagem máxima utilizada para esta linhagem foi de 20.

3.2. Origem e cultivo de *Trypanosoma cruzi*

3.2.1. Cepas de *T. cruzi* e cultivo de tripomastigotas de cultura de tecido

Todos os estoques de *T. cruzi* foram transferidos do *Institut Pasteur Korea* (IPK – Bundang-gu, Coréia do Sul) para o Laboratório Nacional de Biociências (LNBio – Campinas, Brasil). Originalmente, um estoque da cepa Y (estoque 1) foi cedida por A. Avila (Instituto Carlos Chagas, Fiocruz - Curitiba - Brasil), um segundo estoque da cepa Y (estoque 2) foi cedido por S. Schenkman (UNIFESP, São Paulo - Brasil); a cepa CL Brener foi cedida por J. F. Silveira (UNIFESP, São Paulo - Brasil); as cepas Sylvio X10/1 e ARMA13 cl1 foram doadas por M. Miles (*London School of Hygiene and Tropical Medicine*, LSHTM – Londres, Reino Unido). Os clones 92-80 cl2, Tula cl2 e ERA cl2 também foram cedidos por M. Miles, entretanto os dois primeiros foram originalmente isolados pelo grupo de M. Tibayrenc (*Institut de Recherche pour le Developpement* - Montpellier, França), enquanto o ERA cl2 foi isolado por H. Carrasco (*Laboratorio de Biología Molecular de Protozoarios*, Instituto de Medicina Tropical, UCV – Caracas, Venezuela).

As formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante da cultura de LLC-MK₂ infectadas com *T. cruzi*. As culturas de Sylvio X10/1, ARMA13 cl1, ERA cl2, 92.80 cl2, Tula cl2, CL Brener e Y (estoque 2) foram mantidos em meio DMEM *high*, enquanto a cultura de Y (estoque 1) foi mantida em meio DMEM de baixa glicose (Vitrocell)

suplementado com 2% (v/v) de FBS (Gibco) e *pen-estrep* (Gibco). Este meio será abreviado aqui como meio DMEM *low*.

A tabela 1 apresenta todas as cepas e clones utilizados neste trabalho, assim como informações gerais sobre as linhagens.

Com intuito de manter a qualidade dos ensaios fenotípicos, todas as culturas de células de mamíferos e parasitas foram inspecionadas rotineiramente para verificar contaminação com micoplasma. Os testes foram realizados por meio do *kit* de detecção MycoAlert (Lonza) com leituras de luminescência no leitor de placas EnVision (Perkin Elmer).

Tabela 4. Informações gerais sobre as cepas de *T. cruzi* utilizadas no ensaio de HCS. Local de origem refere-se à localização geográfica de onde a cepa original foi isolada, independente de posteriores clonagens em cultura *in vitro*.

DTU	Região de ocorrência da doença de Chagas	Cepa	Espécie hospedeira original	Local de origem
I	Norte da Amazônia	Sylvio X10/1	<i>Homo sapiens</i>	Pará, Brasil
II	Central e costeira do Brasil	Y	<i>Homo sapiens</i>	São Paulo, Brasil
III	Amazônica	Arma13 cl1	<i>Dasypus novemcintus</i>	Boquerón, Paraguai
IV	Venezuela e Amazônia brasileira	ERA cl2	<i>Homo sapiens</i>	Anzoátegui, Venezuela
V	Cone sul da América do Sul	92.80 cl2	<i>Homo sapiens</i>	Santa Cruz, Bolívia
VI	Cone sul da América do Sul	Tula cl2	<i>Homo sapiens</i>	Tulahuen, Chile
		CL Brener	<i>Triatoma infestans</i>	Rio Grande do Sul, Brasil

3.2.2. Clones de *Trypanosoma cruzi* e processo de seleção de resistência *in vitro* ao ravuconazol

Os clones de *T. cruzi* resistentes ao ravuconazol foram selecionados, *in vitro*, no IPK, sendo posteriormente transferidos, recuperados e cultivados no LNBio, a partir de 2015. Anteriormente à seleção, parasitas do estoque 2 da cepa Y (ver seção 3.2.1.), que foi mantida continuamente *in vivo* em camundongos, foi clonado por meio de diluição limitante em microplacas de 96 poços (Greiner Bio-One). As etapas de cultura, clonagem e obtenção dos estoques resistentes foram realizadas por M. A. Giardini, H. Kim, L. Gaspar e L. Naves.

Foram escolhidos, então, os clones que geraram o maior pico de tripomastigotas no sobrenadante de cultura de LLC-MK₂ em um período mais curto de tempo (esse perfil, somado a capacidade de invasão e replicação das formas de epimastigota e amastigota caracterizam o *fitness* neste trabalho). Os clones foram posteriormente submetidos a seleção por pressão de ravuconazol em cultura e, entre todos os clones testados, o clone H10 (referente a sua posição na microplaca de cultura) mostrou-se mais estável na presença do fármaco, em relação aos demais. A seleção foi executada por meio do cultivo do clone H10 em cultura de célula LLC-MK₂ (conforme descrito anteriormente) sob concentração crescente de ravuconazol, começando em 1 nM. Durante o processo de seleção, a pressão do composto foi eventualmente removida e posteriormente reintroduzida (processo de seleção por pressão do tipo *on/off*), com a intenção de recuperar o *fitness* do clone e facilitar a estabilização da resistência. Ao longo do processo de seleção, amostras de estoques do clone H10 resistente foram congeladas sob diferentes concentrações de pressão de ravuconazol (2 nM, 4 nM, 8 nM, etc.). O clone resistente à maior concentração de ravuconazol foi o que cresceu sob 500 nM do fármaco, sem alterações expressivas no crescimento *in vitro* e mantendo a viabilidade dos parasitas (este estoque é aqui denominado H10-R, “*resistant*”). Tentativas de elevar a concentração de ravuconazol além de 500 nM na cultura dos clones H10 geraram estoques menos estáveis (ciclo de infecção *in vitro* extremamente variável – baixíssimo rendimento de saída de tripomastigotas). Todos os clones foram cultivados em células LLC-MK₂ com meio DMEM *high* (como descrito para as outras cepas de *T. cruzi* em 3.2.1.

– exceto pelo soro suplementado neste meio foi 10% (v/v) de soro cósmico de bezerro – CCS, Hyclone – substituindo do FBS utilizado para outras cepas e clones de *T. cruzi*).

Como controle, um estoque do clone H10 foi mantido paralelamente em cultura contínua *in vitro*, entretanto sem a pressão do ravuconazol (este clone é aqui denominado H10-LT, “*long term*”): o racional foi comparar se o fenótipo de resistência ao fármaco (e/ou eventuais mutações/aberrações encontradas no clone H10-R) estavam efetivamente associadas com a pressão do ravuconazol ou simplesmente causadas aleatoriamente dado o longo período de contínuo cultivo *in vitro*. Também foi congelado um estoque do clone H10 antes do início do processo de indução da resistência – o qual foi mantido por poucas passagens em cultura – este estoque é aqui denominado H10-S. Após a recuperação do clone H10-R em cultura *in vitro*, seu cultivo foi estabelecido em frasco de cultura T175 (contendo células hospedeiras LLC-MK₂) com 25 mL de meio de cultura suplementado com 2,5 µL de ravuconazol a 5 mM, atingindo a concentração final de 500 nM na cultura (concentração final de DMSO a 0,01%) - o mesmo procedimento foi executado, adaptando a concentração e volume do fármaco, para a cultura dos outros estoques resistentes: 2 nM, 4 nM, 8 nM, 16 nM, 64 nM, 128 nM e 1 µM. O meio suplementado com ravuconazol foi trocado a cada 3 – 4 dias, a fim de evitar a degradação/esgotamento do fármaco. Após sucessivas passagens *in vitro* do H10-R, separou-se um estoque dos parasitas em um frasco de cultura e a pressão do fármaco foi removida, mantendo-o continuamente *in vitro* – em paralelo ao H10-R - apenas sob 0,01% de DMSO (este estoque é aqui denominado H10-R-NP, “*no pressure*”). A **tabela 4** indica os clones utilizados neste estudo e suas respectivas nomenclaturas.

Tabela 5. Nomenclatura de variantes de cultura da cepa Y.

Nomenclatura	Significado	Pressão de fármaco
Y estoque 1	Estoque de cepa Y sensível ao benznidazol	Não
Y estoque 2	Estoque de cepa Y parcialmente resistente ao benznidazol; originou o clone H10	Não
Y cIH10 ou H10-S	Estoque parental do clone de Y – estoque 2 - (mantido <i>in vitro</i> por poucas passagens – no máximo oito -)	Não
H10-LT	Estoque do clone H10 mantido continuamente em cultura <i>in vitro</i> , em paralelo a cultura de H10-R; é usado como controle para variações ou aberrações genéticas/fentípicas que possam ser atribuídas ao longo período de cultura <i>in vitro</i> (independentemente da pressão de fármaco)	Não
H10-R	Estoque do clone H10 mantido sob pressão crescente em padrão <i>on/off</i> , até atingir níveis de infecção estáveis com ravuconazol a 500 nM	Sim (ravuconazol a 500 nM)
H10-R-NP	H10-R no qual a pressão do composto foi removida (<i>NP = No Pressure</i>); utilizado em estudos de estabilidade e manutenção da resistência na ausência da pressão do fármaco	Não (apenas DMSO 0,01%)

3.2.3. Cultura da fase de inseto: diferenciação e crescimento

Com intuito de diferenciar os estoques do clone H10 em epimastigotas, tripomastigotas foram coletados da cultura de infecção de LLC-MK₂, centrifugados e ressuspensos em meio LIT (pH 7,2) na densidade de 5×10^5 tripomastigotas/mL, e incubados a 28°C. O meio LIT foi preparado com pequenas modificações do protocolo da ATCC (223): 4g de NaCl, 5g de caldo de infusão de fígado (Sigma-Aldrich) e 0,8 g de glicose. O meio LIT foi autoclavado a 121°C durante 15-20 min e posteriormente suplementado com 10 % (v/v) de FBS e solução de *pen-strep*. Por 17 dias foram

realizadas contagens manuais diárias, a partir do dia de adição dos tripomastigotas no meio LIT, a fim de definir o perfil de epimastigogênese dos estoques H10-S, H10-LT e H10-R. A curva de crescimento iniciou com a densidade de 1×10^5 epimastogotas/mL para todos os clones, estes eram cultivados em frascos de cultura tipo T25 (Sarstedt). As contagens foram realizadas em duplicata (duas contagens independentes) com repetição (dois frascos diferentes de cultura para cada clone). Posteriormente, quando as culturas de epimastigotas já haviam se estabilizado, foram realizadas contagens manuais diárias dos estoques H10-S, H10-LT, H10-R e H10-R-NP, por 22 dias, com intuito de determinar a taxa de crescimento de cada clone; antes de iniciar esta contagem comparativa, os epimastigotas do estoque H10-R, em elevada densidade, foram diluídos e divididos em frascos distintos: enquanto um foi reinserido o ravuconazol a 500 nM na cultura (sendo este denominado H10-R+) o outro foi mantido sem o ravuconazol (H10-R-) – o fármaco foi adicionado na cultura de H10-R+ a cada 7 dias (já que o meio de cultura não era trocado, garantindo assim processamento/degradação total do composto antes da reinserção). A contagem da curva de crescimento se iniciou com todos estoques na mesma densidade de 1.0×10^5 epimastigotas/mL; as contagens foram realizadas em duplicata (duas contagens independentes) com duas repetições (epimastigotas de dois frascos diferentes de cultura para cada clone).

O tempo de duplicação foi calculado baseado na taxa entre o período de crescimento em 48 h (durante a fase de crescimento exponencial) e o número de gerações (n), o qual pode ser calculado de acordo com as **equações I e II**

$$\text{I) tempo de duplicação (dt) = período de crescimento da cultura / n}$$

$$\text{II) } n = \frac{\text{LnX}^{\text{-dia final*}} - \text{LnY}^{\text{-dia inicial*}}}{0,693}$$

* X-dia final e Y-dia inicial referem-se a quantidade de parasita contados no último e no primeiro dia do crescimento exponencial da cultura, respectivamente. A mesma equação foi utilizada para calcular o tempo de duplicação para a fase amastigota, exceto que para essa fase o período de 72 h foi levado em consideração.

3.2.4. Metaciclogênese: ciclo do parasita completo *in vitro*

Após a realização da epimastigogênese e a realização de caracterização fenotípica a partir de clones H10, o conteúdo total dos frascos de cultura de epimastigotas de H10-S, H10-LT, H10-R e H10-R-NP foi centrifugado e ressuspenso em meio Graces (Vitrocell), suplementado com 10% (v/v) de FBS e solução *pen-strep*; os frascos de cultura foram mantidos nas mesmas condições dos epimastigotas. As avaliações visuais foram realizadas diariamente e sempre que os tripomastigotas metacíclicos eram evidentes nos frascos de cultura (dentro de um número relativamente elevado de indivíduos), estes foram transferidos para frascos de cultura LLC-MK₂ para infectarem as células de mamífero e prosseguirem no estágio intracelular, finalizando o ciclo *in vitro*. Os clones submetidos ao ciclo completo *in vitro* foram reavaliados em relação a susceptibilidade aos fármacos referência testadas.

3.3. Obtenção e preparo dos compostos

3.3.1. Origem dos compostos

Benznidazol (BZL) foi cedido pela Nortec Química (Duque de Caxias, Brasil); os compostos nifurtimox (NFX), posaconazol (PSL), UDO (BS1246) e UDD (BS0967) foram obtidos da Epichem Pty Ltda (Bentley, Austrália), assim como os compostos do programa de otimização de *leads* do DNDi: A, B, C, D, E, F, G, H, I e J. A anfotericina B (AMB), os compostos azóis fluconazol (FCL), itraconazol (ITL), cetoconazol (KTL) e voriconazol, além dos *hits* da triagem da biblioteca LOPAC: FPL 64176, entecavir, AEG 3482 e CB1954 foram comprados da Sigma-Aldrich (Saint Louis, E.U.A). O ravuconazol (RVL) foi fornecido pela empresa Eisai Ltda (Tóquio, Japão).

3.3.2. Preparo da solução de compostos

Todos os compostos foram enviados na forma sólida e dissolvidos no volume apropriado de dimetilsulfóxido 100% (DMSO, Sigma-Aldrich) para preparar alíquotas de solução estoque. Benznidazol, posaconazol e ravuconazol e foram dissolvidos nas

concentrações finais de estoque de 40, 80 e 80 mM, respectivamente. Já o nifurtimox, anfotericina B, os fenarimóis (BS1246, BS0967), os demais azóis (fluconazol, itraconazol, cetoconazol e voriconazol) e os compostos *leads* do DNDi foram dissolvidos na concentração estoque de 10 mM, com exceção dos compostos B e G (*leads* do DNDi) que foram preparados a 5 mM devido a ocorrência de precipitação quando em concentrações mais elevadas. Todas as alíquotas foram mantidas congeladas sob - 80 °C, protegidas da luz, e submetidas a no máximo três ciclos de congelamento-descongelamento com intuito de garantir a integridade química dos compostos.

3.4. Bibliotecas de compostos

3.4.1. Biblioteca MNHN

Uma biblioteca contendo 1.604 amostras (1.476 moléculas sintéticas e 164 extratos naturais) foi fornecida do Muséum National d’Histoire Naturelle (MNHN - Paris, França), aqui abreviada por biblioteca MNHN. As amostras da biblioteca MNHN foram enviadas na formatação de uma microplaca de 96 poços com conteúdo de 30 µL/poço já dissolvidas nas concentrações estoque de 0,1 mg/mL para as amostras sintéticas e 1,0 mg/mL para os extratos naturais. As amostras foram transferidas manualmente para uma microplaca estoque de polipropileno com 384 poços (Greiner BioOne) – aqui chamadas de placa-estoque. As placas-estoque foram mantidas sob - 20°C. Dados de características físico-químicas e/ou origem de extratos naturais que compõem a MNHN são conhecidos apenas pelo grupo provedor da biblioteca.

3.4.2. Biblioteca LOPAC

Uma segunda biblioteca contendo uma coleção de 1.280 compostos farmacologicamente ativos foi adquirida (LOPAC[®] 1280 - Sigma-Aldrich), aqui chamada de biblioteca LOPAC; as amostras presentes na coleção são moléculas *drug-like* avançadas que atuam sobre diversas vias conhecidas de neurotransmissão e sinalização celular, como por exemplo: apoptose, regulação gênica, fosforilação, sinalização lipídica, entre outras, segundo informações do fabricante. Os compostos da biblioteca LOPAC foram

enviados na concentração de 10 mM em DMSO 100% e dispostos na formatação de microplaca de 96 poços (16 placas) com conteúdo de 25 μ L/poço. As amostras foram reformatadas para placas estoque e armazenadas conforme protocolo descrito para a biblioteca MNHN. Para execução da triagem primária em concentração única de 10 μ M, placas estoque de 1 mM foram preparadas a partir da transferência de 1,2 μ L da placa estoque a 20 mM em 10 μ L de DMSO 100%.

3.4.3. Biblioteca Pathogen Box

A biblioteca denominada Pathogen Box, foi doada pela instituição Medicines for Malaria Venture (MMV) e contém 400 moléculas *drug-like* ativas contra diversos patógenos, em sua maioria associados com doenças negligenciadas (<http://www.pathogenbox.org>). Os compostos da biblioteca Pathogen Box foram enviados nas mesmas condições (concentração e configuração, exceto pelo volume menor de 10 μ L/poço) da biblioteca LOPAC e foram reformatados e armazenados conforme protocolo descrito anteriormente. Uma placa estoque diluída de 4 mM foi preparada a partir da placa estoque de 10 mM (4 μ L da placa estoque foram transferidos para 6 μ L de DMSO 100%).

3.5. Ensaios de triagem de compostos contra *T. cruzi*

3.5.1. Validação do ensaio

A validação do ensaio primário foi realizada utilizando dados comparativos da atividade em curva dose-resposta (14 pontos de diluição, fator de 2x) do composto referência BZL realizado em quintuplicata (cinco experimentos independentes), enquanto a qualidade (diferença estatisticamente relevante entre os controles) e a robustez (baixa variabilidade entre as replicatas – reprodutibilidade -) do *scale-up* foram medidos através da avaliação de parâmetros quantitativos do ensaio (como taxa de infecção, número total de célula, número médio de parasitas intracelulares) entre uma pequena série de triagem com apenas 2 placas de ensaio e uma rodada de triagem de uma coleção maior contendo 12 placas no total (apenas os controles negativos foram utilizados na análise).

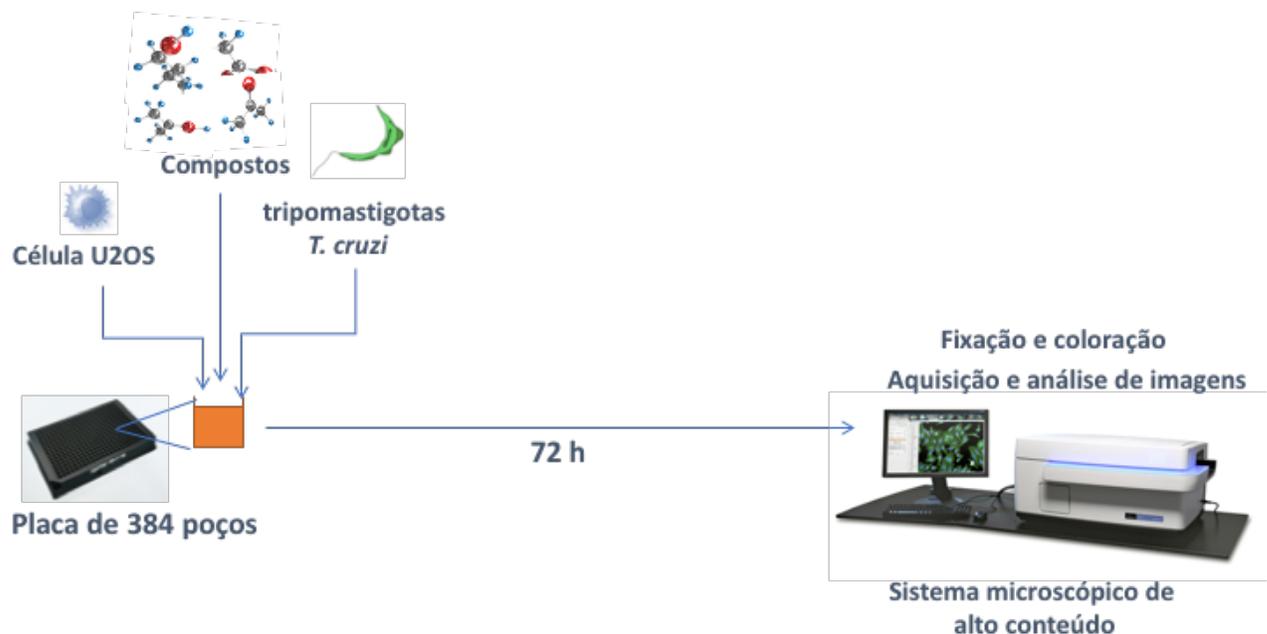
3.5.2. Protocolo 1 (72 h de exposição aos compostos): triagem primária – biblioteca MNHN

O esquema de ensaio de 72 h de exposição aos compostos foi utilizado na triagem primária da biblioteca MNHN, este ensaio é uma versão baseada no método desenvolvido anteriormente pelo nosso grupo no IPK (155), entretanto ampliou-se o tempo de exposição das placas às amostras de 48 h para 72 h com o intuito aumentar a taxa de *hits* (considerando que extratos produtos e produtos naturais em menores concentrações foram triados). O ensaio como um todo durou aproximadamente 12 dias: do crescimento em cultura de células hospedeiras e parasitas ao processamento dos dados gerados pela análise de alto conteúdo (**esquema 3**).

Primeiramente, as amostras foram transferidas das microplacas estoque para as placas de ensaio (microplacas Greiner µclear – Bio-One) previamente pipetadas com tampão fosfato salino (DPBS), a fim de diluir a solução estoque em 16,6 vezes. A transferência foi realizada por meio de uma estação de manipulação de líquidos automatizada (Janus MDT – Perkin Elmer) e as concentrações das amostras na placa, no caso da biblioteca MNHN, foram de 60 µg/mL (extratos) e 6,0 µg/mL (compostos sintéticos) em DMSO 6%. Em seguida, 3.000 células U2OS foram adicionadas por poço, simultaneamente com os tripomastigotas de cultura da cepa Y – estoque 1 - (previamente coletados do sobrenadante da infecção de LLC-MK₂), na densidade de 3,5x10⁵ tripomastigotas/mL (MOI:5) e volume final de 50 µL; todas as células foram ressuspensas em meio DMEM *low* e semeadas com o auxílio de dispensador automatizado (Matrix WellMate® - Thermo-Scientific); após a dispensa do volume de células, a concentração das amostras/DMSO é diluída seis vezes – atingindo 10 µg/mL (extratos) e 1,0 µg/mL (compostos sintéticos) em DMSO 1% (proporção tolerada pelo parasita e célula hospedeira, previamente verificada em cultura de *T. cruzi*). Todos os poços controles também possuem DMSO 1% na concentração final. As microplacas foram então incubadas por 72 h sob 37°C e 5% CO₂, em atmosfera umidificada e ambiente controlado. Células hospedeiras não infectadas (NI) e células infectadas e tratadas com BZL a 400 µM (EC₁₀₀) foram utilizadas como controle positivo, enquanto

poços contendo células infectadas tratados apenas com o solvente DMSO 1% ou com DPBS 1% (caso alguma amostra estivesse dissolvida em solução aquosa diferente do DMSO) foram utilizados como controle negativo (DMSO/DPBS).

A triagem primária para a biblioteca MNHN foi realizada em um único experimento. Além dos controles internos das microplacas de ensaio, 2 placas contendo BZL configurado em dose-resposta (3 curvas de 10 pontos de diluição, fator de 2x) foram introduzidas como primeira e última placa semeadas com as células, a fim de avaliar a variabilidade durante a pipetagem do ensaio (figura). Uma placa contendo apenas DMSO (1%) em todos os poços serviu para avaliar a variabilidade da infecção nas diferentes posições da microplaca de 384 poços.



Esquema 3. (página anterior) Etapas do ensaio do protocolo 1 (72h), com adição simultânea, em um único dia, dos componentes célula hospedeira (U2OS), parasitas (cepa de Y *T. cruzi*) e compostos/amostras na placa de ensaio, com 72 horas de exposição do sistema às amostras triadas. Etapas posteriores ao período de incubação indicam processos sucessivos de fixação, marcação com fluoróforo, aquisição e análise de imagens.

3.5.3. Protocolo 2 (96 h de exposição aos compostos): triagem confirmatória da biblioteca MNHN e demais ensaios

O protocolo 2 foi desenvolvido seguindo o ensaio padronizado pelo nosso grupo (206) (**esquema 4**).

Para a triagem confirmatória da biblioteca MNHN, no primeiro dia as células hospedeiras recém tripsinizadas foram semeadas na densidade de $1,75 \times 10^4$ células U2OS/mL em cada poço da microplaca, em 40 μ L de DMEM *high*, e incubadas por 24 h. No segundo dia de ensaio, tripomastigotas da cepa Y (estoque 1) foram coletados do sobrenadante da cultura de LLC-MK₂ e adicionados, em 10 μ L de meio DMEM *low*, sobre as U2OS previamente semeadas em microplacas na densidade de $2,8 \times 10^5$ tripomastigotas/mL (MOI: 4). Tanto as células hospedeiras, como os parasitas foram plaqueados com o auxílio do dispensador automatizado. Ao terceiro dia, as amostras foram diluídas serialmente por um fator de 2 (10 pontos de diluição) em DMSO (100%) nas placas estoque, a fim de serem avaliadas de modo concentração-dependente (curva dose-resposta). As placas intermediárias foram preparadas utilizando uma pipeta manual de 16 canais equipada com ponteiros descartáveis (Thermo Scientific). Foram transferidos 10 μ L da solução de amostras para a placa de ensaio contendo células infectadas com o parasita, atingindo um volume final de 60 μ L/poço e concentração final de DMSO 1%.

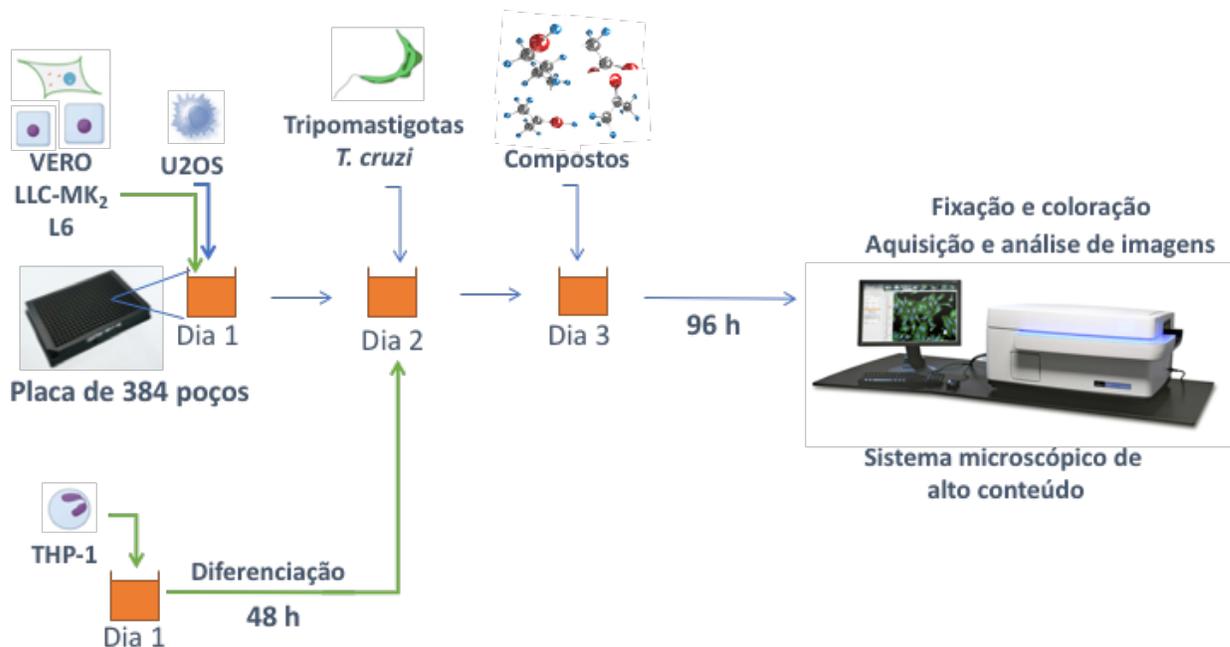
Para as amostras *hits* da biblioteca MNHN, a concentração mais alta testada foi de 1,0 μ g/mL e a mais baixa 1,95 ng/mL. No caso dos compostos referência e compostos *lead* do DNDi, 15 e 14 pontos de diluição foram utilizados, respectivamente (fator de diluição de 2x). As concentrações iniciais de benznidazol, nifurtimox, sulfona de fexinidazol foram de 400, 100, 400 μ M. Já as concentrações que iniciaram as curvas dos compostos posaconazol, ravuconazol e BS1246 foram 8, 8 e 2 μ M, respectivamente. Os demais azóis e fenarimóis, assim como os compostos *leads* iniciaram a curva dose resposta em 100 μ M, exceto pelos *leads* B e G que começaram em 50 μ M. Imediatamente após a adição dos compostos, as placas de ensaio foram incubadas por 96 h nas mesmas condições descritas no protocolo 1. O esquema dos controles também seguiu o mesmo padrão, com exceção do controle com 1% DPBS, que não foi utilizado neste caso. Os

demais ensaios primários (biblioteca LOPAC e Pathogen Box), confirmatórios (de concentração dose resposta), ensaio com diferentes células hospedeiras e outras cepas também utilizaram esse modelo de ensaio (protocolo 2), com algumas adaptações pontuais em alguns sistemas particulares (que serão detalhadas mais adiante). Com exceção das triagens de biblioteca, os demais ensaios que utilizaram o protocolo 2 foram realizadas em duplicata (dois experimentos independentes).

3.5.4. Adaptação do protocolo de ensaio para outras linhagens celulares

A padronização do protocolo de ensaio com a diferentes células hospedeiras considerou parâmetros quantitativos, como taxa de infecção, o número total de células/poço e número médio de parasitas/ célula hospedeira provenientes da análise de todos os poços de uma microplaca de 384 poços tratados com DMSO a 1%; 2 experimentos independentes foram executados nesta análise. O ensaio com as células hospedeiras distintas, infectadas com o clone Ym foi utilizado para triar a biblioteca LOPAC (todas as amostras triadas contra todas as linhagens de células infectadas com *T. cruzi*).

As células L6, LLC-MK₂ e VERO foram semeadas seguindo o mesmo protocolo da U2OS, entretanto as proporções de célula/poço foram de 300, 500 e 600, respectivamente. As densidades de tripomastigotas/mL foram ajustadas para cada linhagem celular a fim de atingir o MOI:20. As células THP-1 seguiram uma dinâmica distinta: os monócitos foram semeados na densidade de 7.000 células/poço num volume de 25 µL contendo meio RPMI e 50 ng/mL de PMA para diferenciação em células tipo macrófago (**esquema 4**). Após 48 h da adição das células, tripomastigotas foram coletados, centrifugados a 500 rpm e ressuspensos em meio RPMI e adicionados na densidade de $1,4 \times 10^6$ tripomastigotas/mL (MOI:5), num volume de 25 µL. O esquema de adição de compostos e o tempo de exposição de 96 h foram mantidos para todas as linhagens celulares testadas.



Esquema 4. Etapas do ensaio do protocolo 2 (96 h), com adição seriada em dias dos componentes do ensaio: células hospedeiras, parasitas (*T. cruzi*) e compostos/amostras na placa de ensaio, com 96 h de exposição do sistema aos compostos triados. Nos dias 1 e 2 as setas azuis indicam os procedimentos convencionais executados em ensaios confirmatórios com a célula hospedeira U2OS; as setas verdes indicam adaptações para uso de outras linhagens celulares neste ensaio.

3.5.5. Adaptação do ensaio HCS para um painel de cepas de *T. cruzi*

O ensaio foi adaptado do protocolo previamente estabelecido pelo nosso grupo (206); o esquema seguiu o mesmo método descrito na seção 3.5.2. (cepa Y – estoque 1 - infectando a célula U2OS), entretanto as demais cepas e estoques foram ressuspensos em meio DMEM *high* e diferentes densidades foram utilizadas: $1,4 \times 10^6$ (Y – estoque 2 -, Sylvio X10/1, ERA cl2, Tula cl2, 92-80 cl2 e CL Brener) ou $2,8 \times 10^6$ (ARMA 13 cl1) tripomastigotas/mL. As demais etapas do ensaio foram mantidas como descritas acima. A avaliação multiparamétrica do perfil de cada cepa de *T. cruzi* no ensaio HCS foi realizado com base nos dados dos controles negativos obtidos a partir dos experimentos de triagem de compostos *leads*, realizados em duplicata. As diferenças das taxas de infecção e a tolerância distinta ao benznidazol entre os estoques da mesma cepa Y (estoque 1 e 2) foram avaliadas a partir dos controles de placas de ensaio provenientes de 2 ensaios independentes.

3.5.6. Adaptação do ensaio HCS para derivados do clone H10

Os ensaios foram executados como descritos na seção **3.5.2.** Devido a diferentes padrões de infectividade entre os estoques do clone H10, os tripomastigotas de H10-R e H10-R-NP foram plaqueados sob a densidade de $2,8 \times 10^6$ tripomastigotas/mL, enquanto a densidade de $1,4 \times 10^6$ tripomastigotas/mL foi utilizada para os estoques H10-S e H10-LT. Conforme descrito anteriormente, as células U2OS previamente plaqueadas foram infectadas com os diferentes estoques do clone H10 e tratadas 24 h após a adição dos parasitas. O estoque H10-R-NP estava sob cultura sem pressão do ravuconazol por 48 dias quando estes ensaios foram realizados. Os compostos agiram sobre as células por 96 h antes da fixação das microplacas.

Os compostos referência foram testados no esquema descrito em **3.5.2.**, porém, uma curva dose resposta com 20 pontos de diluição (sob fator de diluição de 2) foi desenhada. A escolha das concentrações dos compostos foi baseada nos valores conhecidos de EC_{50} para cepa Y de *T. cruzi*, entretanto decidiu-se utilizar uma concentração mais elevada para os compostos azóis devido a resistência dos clones a esta classe de compostos, contudo foram consideradas as concentrações máximas de saturação dos compostos no meio (evitando precipitação em concentrações mais elevadas) e a tolerância da célula hospedeira U2OS. A concentração final de DMSO na microplaca de ensaio foi de 1%.

3.5.7. Triagem das bibliotecas LOPAC e Pathogen Box

3.5.7.1. Triagem da biblioteca LOPAC

O esquema de plaqueamento das células hospedeiras (L6, THP-1, U2OS e VERO) e dos parasitas da cepa Y (clone H10), seguiu os protocolos descritos em **3.5.3.** e **3.5.5.**, respectivamente. Apenas a linhagem celular LLC-MK₂ não foi utilizada na triagem primária da biblioteca, dada sua proximidade com a linhagem de escolha VERO. Tratando-se de uma biblioteca de compostos menor, e considerando que várias células

hospedeiras foram utilizadas, as etapas de plaqueamento e adição de fármacos foram realizadas manualmente.

Os compostos de placas de estoque de 1 mM (ver formatação da biblioteca LOPAC em **3.5.2.**) foram transferidos para microplacas de diluição contendo DPBS - placas intermediárias - para diluir os compostos 16,6 vezes (0,6 μ L dos compostos em 9,4 μ L de DPBS), atingindo uma concentração de composto de 60 μ M e 6% de DMSO; finalmente, foram adicionados 10 μ L de soluções de placas intermediárias em placas de ensaio, de modo que a concentração final do composto foi reduzida para 10 μ M; a concentração final de DMSO em todos os poços foi de 1%. Os poços contendo células não infectadas e células infectadas foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. Após a adição do composto, as placas foram incubadas durante 96 h. Além dos controles internos das placas de ensaio, todas as rodadas de triagem continham duas placas de controle de qualidade adicionais contendo os compostos de referência benznidazol e nirfurtimox em curvas dose-resposta (duas curvas/placa). Cada placa de controle foi tratada antes e após a transferência do composto da biblioteca, a fim de verificar a variabilidade do sistema de cultura dentro do período de adição de composto -. Outra placa de controle inclui células hospedeiras infectadas em todos os 384 poços tratados com 1% de DMSO, apenas; A placa é verificada para a homogeneidade da infecção in vitro em toda a placa de ensaio.

3.5.7.2. Triagem da biblioteca Pathogen Box

O esquema de plaqueamento da célula U2OS e dos parasitas das cepas Y (clone H10), Sylvio X10/1 e CL Brener seguiu os protocolos descritos em **3.5.2.** e **3.5.4.**, respectivamente. As etapas de plaqueamento e adição de fármacos foram realizadas manualmente.

Com intuito de comparar os resultados dessa triagem com resultados obtidos contra *Leishmania* spp., decidiu-se utilizar a mesma concentração dos compostos (20 μ M) e do DMSO, que neste caso foi de 0,5%. (e não 1% como nos demais ensaios). Os compostos de placas de estoque de 4 mM (ver formatação da biblioteca Pathogen Box em **3.5.3.**) foram transferidos para microplacas de diluição contendo DPBS - placas

intermediárias - para diluir os compostos 33,3 vezes (0,6 µL dos compostos em 19,4 µL de DPBS), atingindo uma concentração de composto de 120 µM e 3% de DMSO; finalmente, foram adicionados 10 µL de soluções de placas intermediárias em placas de ensaio, de modo que a concentração final do composto foi reduzida para 20 µM; a concentração final de DMSO em todos os poços foi de 0,5%. Os poços contendo células não infectadas e células infectadas foram utilizados como controles positivos e negativos, respectivamente. Após a adição do composto, as placas foram incubadas durante 96 h. A curva dose-resposta de benznidazol, usada como controle de qualidade, foi adicionado juntamente com a segunda placa de compostos, já que os compostos da biblioteca ocuparam apenas a porção da placa até a coluna sete (restando espaço para adicionar o composto referência da coluna 10 até a coluna 19).

3.5.8. Ensaio de cinética de atividade dos compostos contra derivados do clone H10

Com intuito de avaliar a cinética de ação dos compostos referência sobre os amastigotas dos diferentes clones de H10, um ensaio do tipo *time-kill* (tempo de morte) foi desenvolvido com base no ensaio de atividade descrito acima e no protocolo já descrito por nós (206). As densidades de plaqueamento da célula U2OS, assim como as densidades de parasitas (clones) pré-estabelecidas foram mantidas, também utilizou-se o mesmo esquema de diluição para os compostos testados, conforme descrito em 3.5.5.. Para avaliar a cinética de ação dos compostos, oito microplacas de ensaio foram preparadas simultaneamente, submetidas as mesmas etapas do ensaio de atividade e fixadas após diferentes tempos de exposição aos compostos (*time-points*): zero (imediatamente após a adição dos fármacos), 24, 48, 72, 96, 120, 144 e 168 horas. Com uma maior quantidade de placas de ensaio, a placa intermediária de maior volume foi usada (MasterBlock, Greiner); o esquema de diluição foi expandido para 94 µL de DPBS onde foram transferidos 6 µL dos compostos em solução estoque (em DMSO 100%), mantendo, portanto, a proporção de diluição de 16,6 vezes. O clone H10-R-NP estava sob cultura sem pressão do ravuconazol por mais de 80 dias quando estes ensaios foram realizados

3.5.9. Ensaio de combinação de compostos *hits* da biblioteca LOPAC

Nos ensaios secundários com os compostos *hits* da biblioteca LOPAC, as combinações destes compostos entre si e com benznidazol e posaconazol foram avaliadas. Os compostos testados foram comprados em quantidade maior de estoque e confirmados no ensaio com a cepa Y clH10 de *T. cruzi* infectando células U2OS; com base nesses resultados foram extraídos os valores de EC₅₀ utilizados para o cálculo das proporções do ensaio de combinação

O perfil de interações entre os compostos foi determinado usando o método de combinação de fármacos sob razão constante: compostos combinados dois a dois sob diferentes proporções, baseando-se nos valores de EC₅₀. O desenho e execução deste experimento foram realizados por L. M. Alcântara. Para cada interação estudada, diferentes combinações de compostos foram preparadas (razões de EC₅₀ = 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5) em dose-resposta (10 pontos, em um fator de diluição de 2). O plaqueamento das células e parasitas seguiu o esquema das sessões 3.5.2. e 3.5.4.; já o método de diluição e tratamento das placas seguiu o protocolo descrito em 3.5.2.. As placas foram incubadas por 96 h após a adição dos compostos.

3.5.10. Fixação e coloração das placas

Nos diferentes ensaios HCS utilizados, ao término do período de incubação do sistema contendo os compostos, as microplacas foram fixadas por 15 min à temperatura ambiente com uma solução de paraformaldeído 4% em PBS (PFA), seguido por duas lavagens sucessivas com tampão simples (PBS) e marcadas com a solução 5 µM do corante de DNA DRAQ5™ (Deep Red AnthraQuinone 5, Biostatus) por mais 15 min (protegido da luz e em temperatura ambiente). Dependendo da quantidade de placas utilizadas em cada rodada de experimento, as etapas de fixação, lavagem e coloração foram realizadas com auxílio do dispensador automático e da lavadora de placas (ELX405 - BioTek) (por exemplo, quando número de placas era superior a cinco).

3.5.11. Aquisição e análise de imagens

3.5.11.1. Sistema de alto conteúdo – desenvolvimento no equipamento Operetta

Foram adquiridas 4 imagens/poço da placa de 384 poços no sistema de imageamento de alta performance Operetta® (PerkinElmer) sob lentes com magnificação 20x WD (*long working distance*) nas configurações de 90% de energia de excitação, 0% de transmissão, com filtro nos comprimentos de onda de 620nm – 640nm de excitação e 650nm – 760nm para emissão (*far red*). O tempo de exposição configurado para o imageamento foi de 800 ms, deste modo a aquisição completa de uma microplaca de 384 poços (com todos os poços em uso) durou aproximadamente 1 h 15 min.

Após a aquisição, as imagens foram submetidas à análise de alto conteúdo (HCA), que permite a avaliação da atividade antiparasitária das amostras contra o amastigota intracelular de *T. cruzi*. O processamento das imagens foi realizado por meio do *software* Harmony® (Perkin Elmer) com o intuito de identificar, segmentar e contar núcleo e citoplasmas das células hospedeiras, assim como executar a detecção e contabilização de amastigotas presentes na região citoplasmática (**figura 7**). O desenvolvimento da análise de alto conteúdo envolveu a padronização do processamento de imagem com uso de *software* comercial (Harmony – Perkin Elmer). O *software* comercial Harmony® possui uma interface com diversos blocos de análise (denominados *building blocks* – **figura 7** e **figura 8**) que podem ser configurados de maneira sequencial, de acordo com as características da análise. *Scripts* pré-programados, baseados em algoritmos distintos de processamento de imagem, estão disponíveis com parâmetros ajustáveis que possibilitam um ajuste fino do processamento de acordo com as características biológicas do ensaio e particularidades da imagem. A vantagem do uso do *software* comercial em relação ao desenvolvido *in house* é que a metodologia da análise pode ser empregada globalmente por qualquer usuário que tenha acesso ao programa, ao passo que o desenvolvido *in house* requer acesso local ou expertise avançada em computação/processamento de imagens para reproduzir a construção do algoritmo publicado.

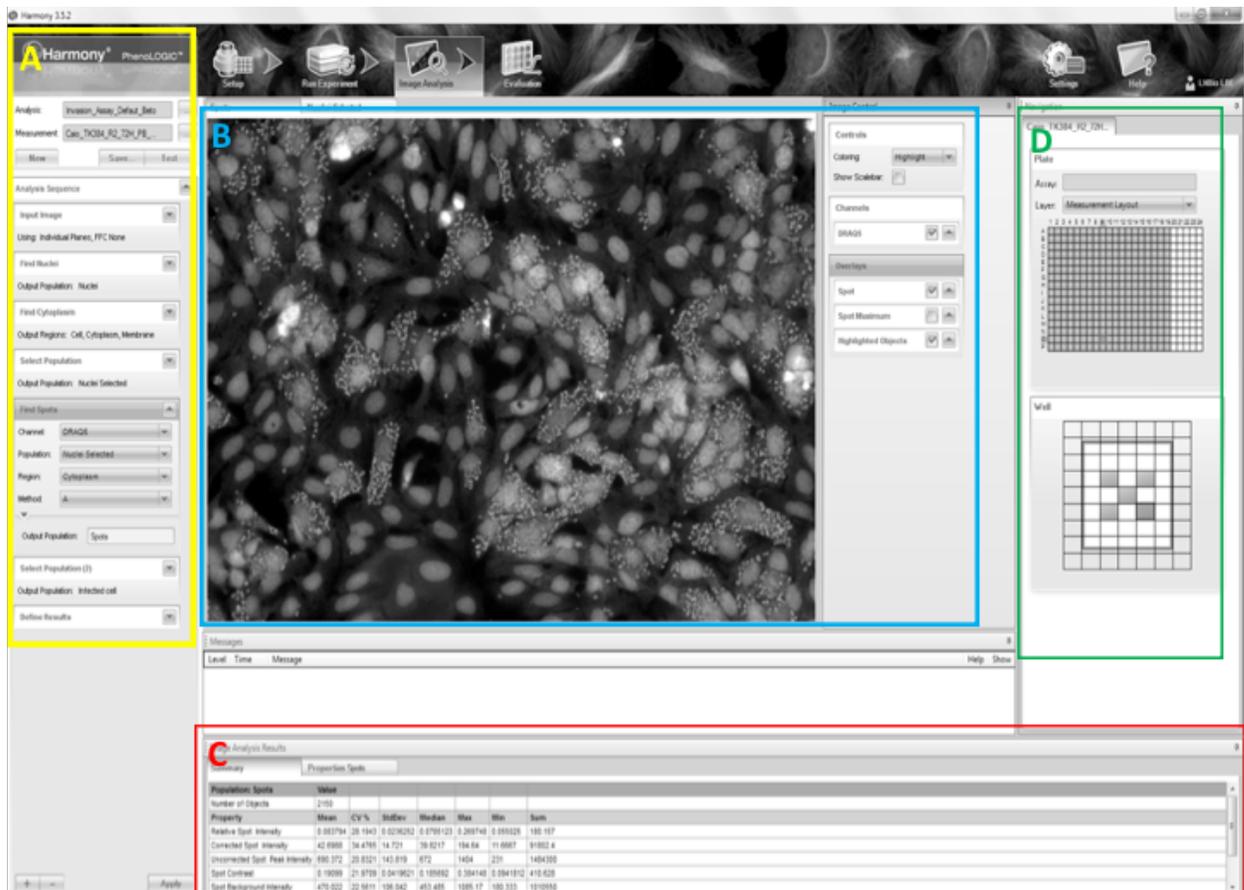


Figura 7. Interface do software de análise de alto conteúdo Harmony. sequência de *building blocks* (blocos de análise) organizados sequencialmente de acordo com os parâmetros avaliados; **B.** Imagem modelo na qual são aplicados os parâmetros de processamento, sendo possível visualizar em tempo real a detecção e segmentação das células; **C.** Valores listados em uma prévia da análise quantitativa dos parâmetros selecionados; **D.** Mapa da placa de ensaio (acima) e as imagens dentro de cada poço (abaixo).

Para a análise de alto conteúdo do ensaio de *T. cruzi*, o sistema de processamento foi ajustado para fornecer os seguintes *readouts* específicos: número de célula hospedeira, taxa de infecção, número total de parasitas em cada poço e número médio de amastigotas/célula infectada. O fluxo de análise de imagens segue as seguintes etapas (**figura 8**).

- A primeira etapa, denominada *Raw image* (**figura 8A**): representa a imagem original obtida pelo sistema de microscopia de alto conteúdo (Operetta); as configurações de excitação, exposição e altura do plano focal foram determinadas

pré-aquisição, a fim de gerar imagens de alta qualidade para prosseguir no fluxo de análise.

- Aplicou-se a análise da etapa *Find nuclei* (**figura 8B**), na qual são delimitados e quantificados os núcleos das células hospedeiras na imagem. A detecção é baseada na diferença da intensidade do sinal de fluorescência da área do núcleo com as demais regiões (*signal to noise ratio*, SNR). Com intuito de estabelecer o melhor método para detectar os núcleos, foram testados quatro *scripts* disponibilizados pelo *software*, ajustando suas configurações e comparando visualmente qual método fornecia os melhores resultados de detecção e quantificação. Após a escolha do método ideal (método A), foi executado um ajuste fino nos subníveis de configuração para aperfeiçoar a detecção dos núcleos baseados em suas características de tamanho, espaçamento entre células, limites mínimos de intensidade de sinal e contraste (**tabela 5**).
- O *building block* configurado na sequência foi o *Find cytoplasm* (**figura 8C**), cuja função é segmentar a região do citoplasma das células hospedeiras na imagem, definindo, portanto, células individuais. A região citoplasmática é detectada como a região marginal ao núcleo que apresenta um sinal de intensidade superior ao do sinal de fundo. Uma característica vantajosa do corante DRAQ5[®] é que, além de marcar o núcleo das células com sinal de fluorescência relativamente alto, o fluoróforo também marca, em menor intensidade, a região citoplasmática; esta marcação citosólica gera uma intensidade de sinal discreta porém suficiente para o *software* distinguir a região celular do sinal de fundo, prescindindo o uso de marcadores secundários para o citosol. Entre os seis *scripts* disponíveis, o método A foi eleito como o mais adequado para a segmentação precisa do citoplasma celular. Um ajuste fino para configurar o limite da intensidade de sinal do citoplasma também foi executado.

- A etapa *Select population* (**figura 8D**) cria uma subpopulação de células a partir da população total da imagem, excluindo as células que apresentam parte de sua área celular não contida nos limites da imagem.
- A etapa que detecta e quantifica os parasitas intracelulares, *Find spots* (**figura 8E**), é configurada para detectar regiões circulares com área reduzida (*spots*) cuja elevada intensidade de sinal se destaca do sinal de fundo, dentro dos limites da região citoplasmática previamente definidos. Os *spots* representam o sinal do DNA marcado do parasita proveniente do núcleo e do cinetoplasto – indistinguíveis sob esta magnificação. O *script* selecionado (método C) permite, após ajustes finos, detectar com precisão os *spots* individuais sem gerar, entretanto, um número excessivo de falsos positivos (neste caso comumente gerados por diferenças naturais do contraste no citoplasma ou presença de detritos celulares). Sob um segundo e terceiro nível de ajustes, foram determinadas as propriedades dos *spots* para realçar a detecção: tamanho (raio do *spot*), contraste mínimo, intensidade de sinal do *spot*, distância mínima entre dois *spots* e entre os *local maximum* dos picos de sinal. Após configurado, o *script* foi testado nos controles positivo e negativo, a fim de medir a detecção de falsos positivos; um limite máximo de 10% de detecção de falsos positivos foi estabelecido para o ajuste da análise. A acurácia da detecção e quantificação dos *spots* por este protocolo foram conferidas através da comparação dos resultados obtidos pelo *software* com contagem manual feita por integrantes do nosso grupo, não havendo diferenças significativas entre as duas abordagens (dados não mostrados).
- *Select population II* (**figura 8F**) é a etapa que seleciona e separa as células infectadas de toda a população celular. O método Filtrar por Propriedade (*filter by property*) foi ajustado para considerar a seleção da população “Célula Infectada”: toda célula que apresentasse ao menos um *spot* na região do citoplasma.

- *Define results* é a última etapa dos blocos de análise onde são configurados quais resultados serão exportados. O usuário pode selecionar uma vasta série de *outputs*, tais quais informações descritivas das etapas de análise e dados quantitativos gerados a partir de fórmulas (*formula output*). Estabelecemos os seguintes *outputs* quantitativos (gerados para cada poço da microplaca): número total de células hospedeiras, número de células selecionadas (após exclusão de células na borda das imagens), número de células infectadas, número total de *spots*, média e desvio padrão do número de *spots*/célula infectada e taxa de infecção.

Todos os detalhes do fluxo de análise estão descritos na **tabela 5**.

3.5.11.2. Sistema de alto conteúdo – adaptação para o equipamento IN Cell 2200

O sistema de HCS também foi usado no equipamento IN Cell 2200 (General Electric), onde o padrão de 4 imagens/ poço também foi utilizado na lente de 20x de aumento deste sistema de microscopia. A excitação da lâmpada (LED) foi de 30%, o tempo de exposição selecionado foi de 2,5 s e o modo de aquisição foi o 2-D (sem deconvolução). Após a aquisição, as imagens foram analisadas, para uma avaliação comparativa, tanto no *software* Harmony (Perkin Elmer) como no *software* Investigator (General Electric). O desenvolvimento da análise para o Investigator foi semelhante ao do Harmony, neste sentido os mesmos parâmetros de *outputs* foram desenhados para análise dentro das configurações deste programa. Com intuito de testar se o protocolo de triagem desenvolvido era compatível com outras plataformas de alto conteúdo, as microplacas foram imageadas no equipamento IN Cell 2200 e processadas no *software* Investigator (versão integrada ao sistema de microscopia IN Cell). Posteriormente, as imagens obtidas no IN Cell também foram processadas no Harmony através da plataforma Columbus (Perkin Elmer), que permite o acesso de imagens de diversos equipamentos de HCS pelo *software* de análise Harmony (dados não mostrados). As imagens obtidas no IN Cell destacam-se pelas maiores dimensão e resolução, além de

um tempo relativamente menor para ler uma microplaca de 384 poços inteira, em relação ao Operetta (**figura 9**).

O *software* de análise Investigator foi utilizado na análise seguindo os protocolos semelhantes aos desenvolvidos no Harmony, entretanto, a etapa de delimitação da célula (equivalente ao *Find cytoplasm*) não pôde ser realizada com êxito. O Investigator é incapaz de segmentar a região citoplasmática utilizando o mesmo sinal de fluorescência daquele determinado para a detecção e segmentação do núcleo; como o protocolo foi estabelecido com o uso de um único corante, esta etapa foi prejudicada. Alternativamente, o Investigator fornece um processamento que considera uma região citosólica com base em um crescimento vetorial a partir da localização do núcleo (porém sem usar o sinal de fluorescência). Considerando as variações morfológicas e a plasticidade da região citosólica das células hospedeiras (especialmente quando infectadas com alta carga de amastigotas), o processo de delimitação vetorial a partir do núcleo pode segmentar erroneamente a célula. Este processo pode ser evitado ao utilizar outro corante para marcar o citosol.

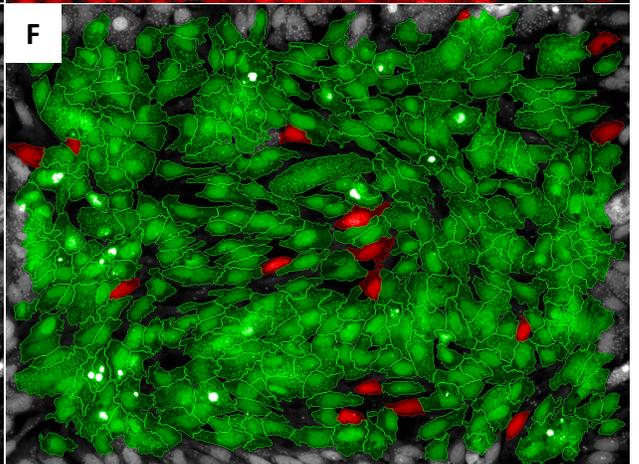
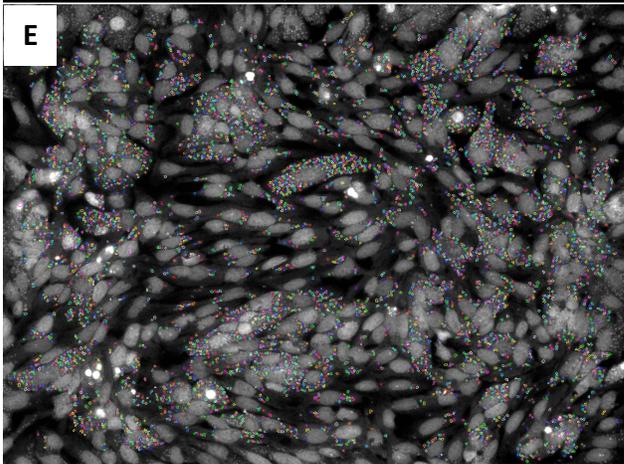
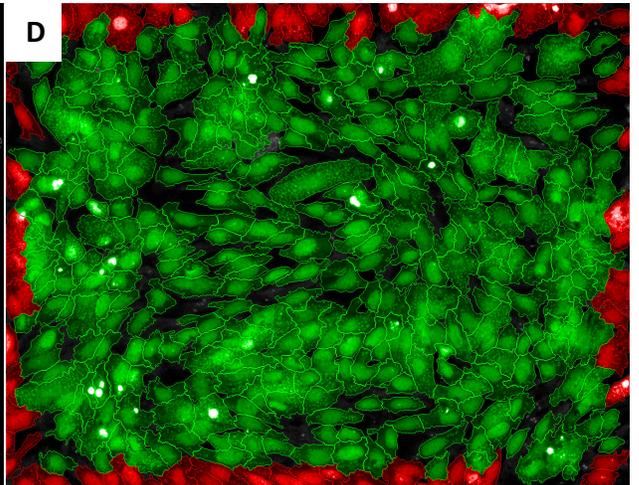
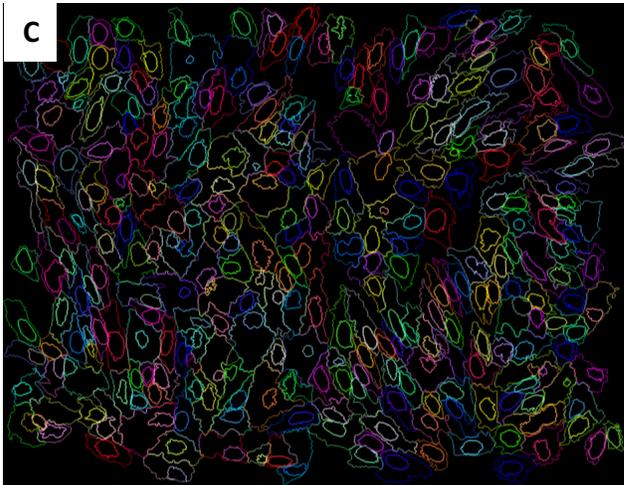
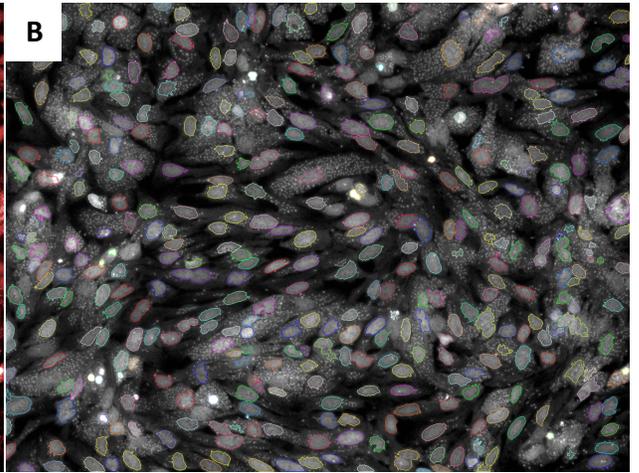
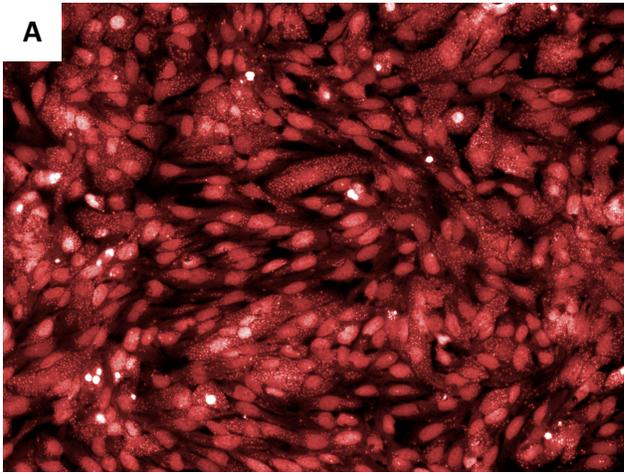


Figura 8. (página anterior) Etapas do processamento de imagens via software Harmony. Processamento sequencial das imagens obtidas do ensaio HCS para *T. cruzi* (esquema de “building blocks”) por meio do software comercial Harmony (Perkin Elmer): **A.** imagem bruta adquirida pelo sistema de microscopia de alto conteúdo Operetta, **B.** “Find nuclei”: ferramenta utilizada para delimitar e quantificar a região do núcleo da célula hospedeira U2OS, **C.** “Find cytoplasm”: etapa que visa delimitar a área citoplasmática e segmentar individualmente cada célula e seus limites, **D.** “Select population”: restringe a população de objetos a região celular integrada nos limites da imagem (excluindo os da região da borda da imagem), **E.** “Find spots”: ferramenta utilizada para delimitar e quantificar o spot fluorescente que representa cada parasita intracelular (DNA do núcleo e do cinetoplasto) e **F.** “Select population II, separa e quantifica as células infectadas (que apresentam ao menos um spot na região do citoplasma) da imagem. O output multiparamétrico gerado pelo software fornece o número total de células hospedeiras, a taxa de infecção e o número médio de parasitas em cada célula hospedeira.

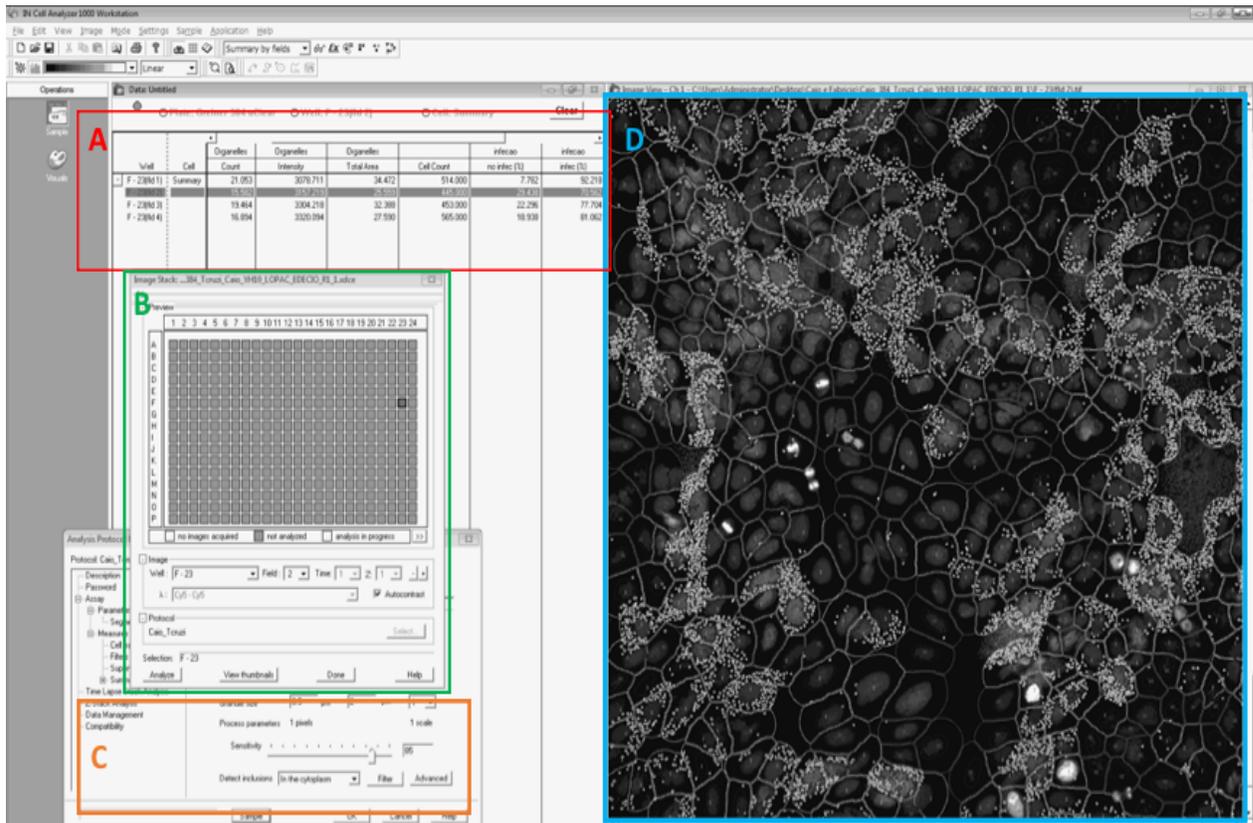


Figura 9 Interface do software de análise de alto conteúdo IN Cell Investigator. O layout simplificado da interface do Investigator assemelha-se ao do Harmony. **A.** Lista indicando os valores preliminares da análise feita na imagem com os parâmetros selecionados; **B.** Mapa da microplaca de ensaio para seleção dos poços; **C.** Painel com parâmetros que configuram a análise e as propriedades que podem ser ajustadas para otimizar a análise; **D.** Imagem onde é possível visualizar, em tempo real, as etapas de seleção e segmentação das células.

Tabela 6. Parâmetros da análise de alto conteúdo para processar imagens obtidas no screening de T. cruzi no software Harmony.

Etapa (building block)	Objetivo	Parâmetros	Especificações	Configuração
<i>Find nuclei</i> (método A)	Determinar o núcleo da célula hospedeira e contar a população total	<i>Common Threshold</i>	Determinação do nível mínimo de intensidade de pixel para a área correspondente ao núcleo	0.40
		Área	Ajuste do tamanho mínimo da área do núcleo	> 60 μm^2
		<i>Split factor</i>	Define se objetos maiores serão divididos em dois ou mais objetos menores	7.0
		<i>Individual threshold</i>	Determinação da intensidade do limite do sinal para cada objeto individualmente	0.65
<i>Find cytoplasm</i> (método A)	Segmenta individualmente a região celular	Contraste	Configuração do limite inferior para o contraste utilizado na detecção de núcleo	> 0.10
		<i>Threshold individual</i>	Determina a intensidade do limite de sinal para cada objeto individualmente	0.15
<i>Select population</i>	Exclusão das células cujas áreas estão fora dos limites da imagem	Filtros comuns	Remoção de objetos à margem da imagem processada	
		Raio	Ajuste do limite superior do raio do <i>spot</i>	≤ 1.44
<i>Find spots</i> (método C)	Detectar e quantificar parasitos intracelulares	Contraste	Configuração do limite inferior para o contraste utilizado na detecção dos spots	> 0.16
		<i>Uncorrected spot to region intensity</i>	Configuração do limite inferior do <i>spot</i> e relação a intensidade da região	> 1.1
		Distância	Determinação do limite inferior para a distância entre <i>local maxima</i> de dois spots adjacentes	≥ 0.89
<i>Select population II</i>	Detecta células infectadas na população total	<i>Spot peak radius</i>	Definição do raio da área sobre a qual o pico de intensidade do spot está integrado	0.00
		Filtrar por propriedade	Definição de como o <i>software</i> irá determinar se uma célula está infectada	# de spots no citoplasma ≥ 1
<i>Define results</i>	Fornecer resultados multiparamétricos configurados pelo usuário		Determina quais <i>outputs</i> serão gerados após a análise das imagens	

3.6. Análise de dados

3.6.1. Normalização dos dados obtidos na HCA

A razão entre o número de células infectadas e o número total de células foi calculada, definindo a taxa de infecção (*infection ratio*, IR). Os dados brutos referentes aos valores de IR foram normalizados em função dos controles negativo (células infectadas não tratadas) e positivo (células não-infectadas) a fim de determinar a atividade antiparasitária normalizada, de acordo com a **equação (III)**:

$$(III) \text{ Atividade Normalizada (NA)} = [1 - (IR_A - M.IR_N) / (M.IR_P - M.IR_N)] \times 100$$

Onde: IR_A : taxa de infecção dos poços contendo amostras

$M.IR_N$: média da taxa de infecção dos poços de controle negativo

$M.IR_P$: média da taxa de infecção dos poços de controle positivo

A razão em utilizar o controle positivo de células não-infectadas ao invés do controle tratado com benznidazol 400 μ M (EC_{100}) se deu pela ocorrência dos estoques, cepas e clones resistentes ao benznidazol que foram eventualmente avaliados.

3.6.2. Tratamento estatístico: comparação entre grupos e correlação

A comparação entre grupos nos experimentos foi realizada por meio do teste estatístico ANOVA e o Tukey como pós-teste. Para análises de correlação o teste Spearman foi utilizado, além da análise de ajuste da curva (*goodness of fit*) e medida do R^2 em curvas dose resposta. O tratamento estatístico foi executado por meio do *software* Prism versão 7.0 (GraphPad).

3.6.3. Controle de qualidade da triagem: fator Z'

O controle de qualidade do ensaio foi medido pelo fator Z' (224). Este fator estatístico foi calculado para cada placa das rodadas de experimento, levando em

consideração as médias e desvios da taxa de infecção dos controles positivo e negativo, seguindo a **equação IV**:

$$(IV) \text{ Fator } Z' = 1 - [3x (DP.IR_P + DP.IR_N) / |(M.IR_P - M.IR_N) |]$$

Onde: **DP.IR_P**: desvio padrão da taxa de infecção dos poços de controle positivo

DP.IR_N: desvio padrão da taxa de infecção dos poços de controle negativo

M.IR_N: média da taxa de infecção dos poços de controle negativo

M.IR_P: média da taxa de infecção dos poços de controle positivo

Foram considerados ensaios excelentes, aqueles cujos valores do fator Z' das placas foram iguais ou superiores a 0,5, o que indica a existência de uma janela de separação satisfatória entre os controles do ensaio. No entanto, dada a complexidade do ensaio fenotípico, valores de fator Z' entre 0,1 – 0,5 ainda são considerados satisfatórios no contexto de HCS.

3.6.4. Análise de dados de triagem de bibliotecas

Dados de triagem primária foram processados utilizando os programas Excel (Microsoft) e Spotfire (TIBCO). Os critérios para seleção de compostos *hits* baseados em valores de atividade e toxicidade variaram de acordo com a biblioteca e células testadas.

Em relação ao ensaio confirmatório e testes e compostos *leads*, compostos referência e de colaboradores, a atividade dos compostos em dose-resposta foi avaliada utilizando o *software* Prism versão 7.0 (GraphPad), a fim de gerar a curva sigmoide por regressão não-linear dos valores e determinar os dados de EC₅₀ e CC₅₀, através da interpolação. Para os propósitos deste estudo, EC₅₀ foi definido como valor de concentração da amostra correspondente a 50% de atividade normalizada máxima (ou 50% de redução da taxa de infecção); já a eficácia mede a resposta máxima (redução da infecção) obtida por uma amostra em uma determinada concentração testada. O perfil de potência das amostras está diretamente relacionado com o seu valor de EC₅₀ – quanto mais potente for a amostra, menor será seu valor de EC₅₀ -, enquanto a eficácia está

relacionada com a atividade máxima (MA) atingida na curva dose-resposta – quanto mais eficaz for a amostra, mais próximo de 100% será o seu valor de MA. A mesma lógica é aplicada para o valor de CC_{50} , que indica a concentração da amostra capaz de reduzir a taxa de célula em 50%; taxa de célula é definida pela razão entre o número total de células do poço tratado e a média de células no controle negativo. A razão entre os valores de CC_{50} pelo EC_{50} configura o índice de seletividade (SI) da amostra testada. Quando a avaliação da taxa celular da amostra na curva dose-resposta não retorna um valor de CC_{50} , o SI é considerado maior ou igual à razão entre a concentração máxima testada e o valor de EC_{50} .

3.6.5. Análise de dados dos ensaios de combinação de compostos

Valores de EC_{50} foram determinados para cada curva dose resposta de cada combinação realizada entre os compostos. Estes valores foram utilizados para calcular as concentrações inibitórias fracionais (FIC), que pode ser expressa através da **equação V**:

$$(V) \text{ FIC} = \text{EC}_{50} \text{ composto em combinação} / \text{EC}_{50} \text{ composto isolado}$$

A partir dos valores de FIC, foram gerados gráficos no modelo de isobogramas. Também foram consideradas as somatórias dos valores de FIC em cada combinação, sendo que as médias dessas somatórias determinaram a classificação do perfil de interação destes compostos. No caso desse estudo, as interações foram classificadas em sinérgicas ($\Sigma\text{FIC} < 0,5$), aditivas ($0,5 < \Sigma\text{FIC} \leq 4$) ou antagonistas ($\Sigma\text{FIC} > 4$) (225).

3.6.6. Análise de relação de estrutura atividade (SAR) e estudos de clusters farmacológicos

As análises feitas com os compostos selecionados da biblioteca MNHN foram realizadas com auxílio de F. Palace. A lista contendo as estruturas químicas dos compostos foi elaborada e fornecida por P. Grellier.

Os estudos de aglomeração hierárquica dos compostos selecionados da biblioteca LOPAC foram realizados através de descritores de pares atômicos e coeficiente de Tanimoto por meio do programa ChemMine Tools (<http://chemminetools.ucr.edu>).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com intuito de organizar e facilitar a leitura, os resultados deste projeto foram divididos em três partes. Na primeira parte, foram abordados os processos de padronização e validação do ensaio fenotípico para *T. cruzi*. A adaptação do ensaio para outras linhagens celulares e outras cepas de *T. cruzi* também estão na parte I, assim como a triagem da biblioteca de compostos MNHN e ensaios confirmatórios e análises dos compostos *hits* selecionados. Também foram abordados os principais resultados dos testes com alguns compostos enviados por colaboradores.

Na parte II constam os resultados da triagem das bibliotecas LOPAC e Pathogen Box, assim como a discussão de como uso de diferentes linhagens celulares (como células hospedeiras) e de diferentes cepas de *T. cruzi* pode afetar o *screening* de compostos em ensaios fenotípicos com amastigotas intracelulares de *T. cruzi*; os resultados de ensaios confirmatórios com os principais *hits* encontrados nessa triagem foram abordados.

Na parte III foram inseridas as análises do fenótipo e genótipo de clones de *T. cruzi* resistentes ao ravuconazol. Também estão apresentados e discutidos os resultados de susceptibilidade destes clones contra diversos fármacos assim como a possível alteração estrutural na enzima alvo do fármaco causada por uma nova mutação no gene da TcCYP51.

Parte I: Padronização e validação do ensaio fenotípico de *T. cruzi*, implementação do ensaio na triagem da biblioteca MNHN e em testes de compostos de colaboradores

4..1. Padronização e validação do ensaio de alto conteúdo para *T. cruzi*

4.1.1. Determinação do número mínimo de imagens por poço

Apesar de todas as vantagens da análise de alto conteúdo, é necessário economizar tempo e recursos na metodologia dos experimentos a partir a otimização dos protocolos de aquisição e processamento de imagens; portanto, uma verificação estatística foi executada a fim de definir o número mínimo de imagens que pode ser adquirido em cada poço sem deixar de representar fidedignamente o poço inteiro. Sob a magnificação da lente de 20x, o poço da microplaca de 384 poços pode ser subdividido em 35 campos de imageamento (cada imagem mede, aproximadamente, 0,35 mm²). Entretanto, a aquisição de todos os campos de imagens em todos os 384 poços levaria aproximadamente 7 h 30 min por microplaca de ensaio (no equipamento Operetta), o que prejudicaria a alta vazão proposta da triagem, além de gerar um grande volume de dados de imagens que precisam ser armazenados a longo prazo, o que por sua vez aumenta o custo do ensaio. Por isso, buscamos determinar o número mínimo de imagens que eram necessários para uma amostragem adequada da população contida no poço.

Foram comparados os valores de atividade (em %) dos controles positivo e negativo provenientes da análise de 35, 5 e 4 imagens de oito poços de cada controle, e não foi constatada diferença estatística para o parâmetro avaliado (**figura 10**). Outros parâmetros como taxa de infecção e número médio de parasitas/célula hospedeira também foram avaliados e apresentaram os mesmos resultados estatísticos; os valores dos parâmetros obtidos a partir de um número de imagens menor que 4 divergiram estatisticamente dos restantes a apresentaram um desvio relativamente alto (dados não mostrados). A aquisição de 4 imagens/poço reduziu a aquisição da microplaca de 384 toda para 1 h 15 min, aproximadamente.

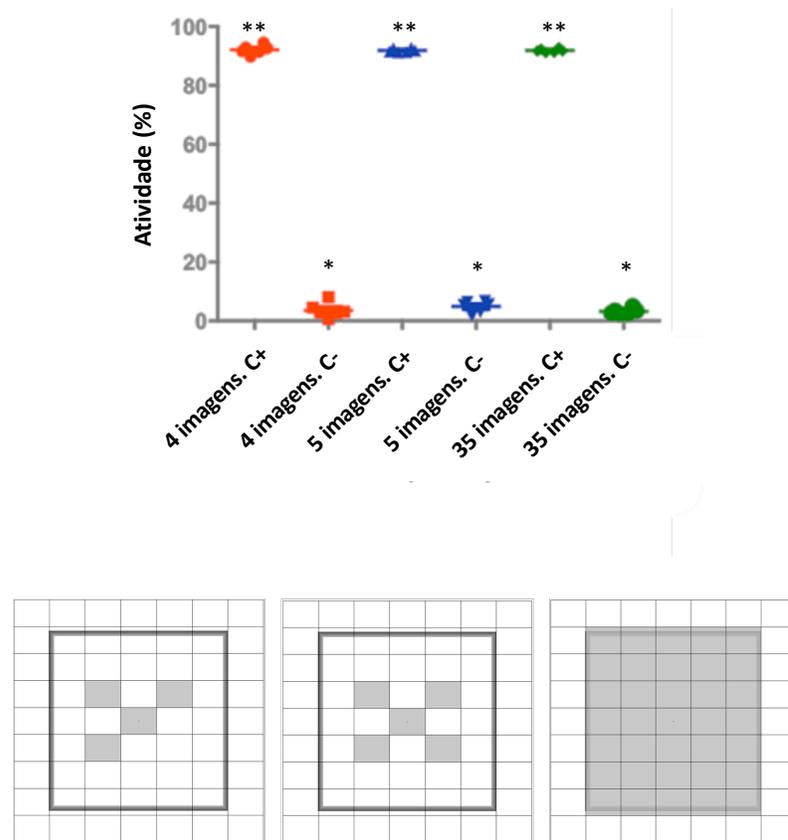


Figura 10. Determinação do número mínimo de imagens adquiridas por poço no ensaio de alto conteúdo. Atividade (em %) foi medida a partir do processamento de quatro, cinco e 35 imagens/poço – mapa do poço na parte inferior da figura -. Foram utilizados, nesta análise, oito poços de controle tratado (C+) e oito poços de controle negativo (C-). Sinais iguais indicam que não houve diferença estatística entre os grupos de controle os diferentes conjuntos de imagens processados ($p < 0,05$).

4.1.2. Padronização do ensaio de alto conteúdo para *T. cruzi*: testando diferentes células hospedeiras

O ensaio proposto de triagem de compostos contra *T. cruzi* busca identificar amostras com potencial contra a fase replicativa intracelular em um sistema que reproduz, *in vitro*, a infecção de células de mamífero pelo parasita. Sabendo da promiscuidade do *T. cruzi* em relação a célula hospedeira, as linhagens celulares U2OS, LLC-MK₂, THP-1 e L6 infectadas com *T. cruzi* foram testadas sob as condições pré-determinadas da triagem, seguido pela avaliação no sistema de imageamento automatizado do Operetta, a fim de definir a linhagem celular mais compatível com o sistema de triagem. As densidades das células hospedeiras (número de células/poço), foram determinadas levando em consideração os dias de incubação dos ensaios, a taxa de crescimento das linhagens celulares e a área de superfície do poço da placa de 384 poços (dados não mostrados). A escolha da célula de linhagem tumoral U2OS como célula hospedeira padrão para os ensaios de alto conteúdo foi baseada nos seguintes fatores:

- Praticidade do cultivo e manutenção *in vitro*, onde não é exigido nenhum agente indutor de diferenciação (como no caso da THP-1, que requer adição de PMA);
- Tempo de duplicação relativamente longo, de aproximadamente 30 h (226), permite ensaios com maiores períodos de incubação – enquanto as linhagens celulares LLC-MK₂ e L6 apresentam um crescimento mais rápido (de aproximadamente 22 h) – o que limita o uso prolongado destas células em microplacas de 384 poços -; além disso a maior taxa de crescimento das células não infectadas, no decorrer do ensaio, pode mascarar a real taxa de infecção causando maior variabilidade (**figura 11B, 11D e 11G**);
- Crescimento aderente em monocamada compacta facilita o imageamento das células U2OS em um único plano (núcleo do parasita e das células

hospedeiras), diferentemente das demais células que apresentam fusão citoplasmática (L6), polinucleação e pleomorfismo (THP-1) ou empilhamento (LLC-MK₂).

- Grande área citoplasmática comporta um maior número de amastigotas intracelulares; o maior espaçamento entre os parasitas na área do citosol favorece a detecção pelo *software* (**figura 11A e 11F**);
- Linhagem celular de origem humana.

Entretanto, a sensibilidade da U2OS à infecção com *T. cruzi* e/ou à exposição das amostras triadas leva, ocasionalmente, a uma redução expressiva no número de células totais - quando comparadas com outras linhagens celulares mais tolerantes - (**figura 11G**). Neste aspecto, é comum notarmos elevados índices de citotoxicidade nos dados de triagem com a célula U2OS. Por outro lado, esta sensibilidade relativamente alta permite a utilização de um critério mais rigoroso para escolha de amostras e compostos ainda mais seletivos do que aqueles testados contra outras linhagens celulares. Após a definição dos parâmetros básicos da infecção (densidade da célula/ poço, número de tripomastigotas adicionados por célula hospedeira), determinou-se o número máximo de passagens da célula (enquanto ela ainda mantinha sua integridade morfológica e perfil de crescimento na cultura).

4.1.3. Padronização do ensaio de alto conteúdo para *T. cruzi*: escolha da cepa e estoque do parasita e análises comparativas

A cepa padrão selecionada para os ensaios fenotípicos foi a Y, a escolha se deu pela facilidade de cultivo com um ciclo consistente e bem estabelecido, possuindo picos constantes de saída de tripomastigotas seis e sete dias após a infecção dos frascos de LLC-MK₂. O rendimento relativamente elevado na saída de tripomastigotas (na média de $7,0 \times 10^6$ tripomastigotas/mL no frasco de cultura T175), em relação às demais cepas,

apontou como uma vantagem na triagem de bibliotecas maiores (sem precisar expandir exaustivamente a cultura). Além disso, a cepa Y apresenta alta infectividade *in vitro*, o que faz com que o ensaio de triagem seja mais robusto, ou seja, com menos variabilidade entre os experimentos e com uma diferença satisfatória do sinal de detecção nos controles positivo e negativo. O critério para a escolha da densidade ideal de $3,5 \times 10^5$ (protocolo de 72 h) e $2,8 \times 10^5$ (protocolo de 96 h) tripomastigotas/mL fundamentou-se na obtenção, ao final de quatro ou cinco dias após a infecção, dos poços do controle negativo com elevadas taxas de infecção (IR) sem causar, em contrapartida, excessiva lise celular.

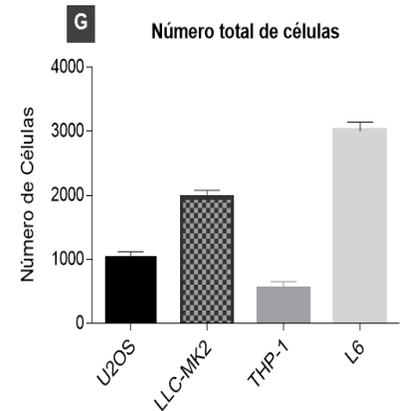
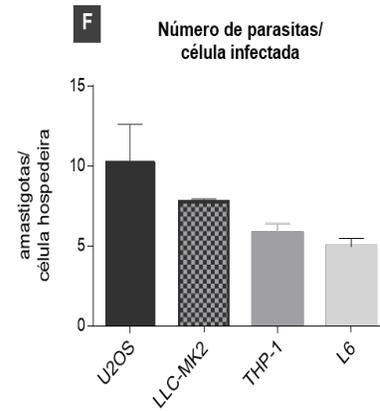
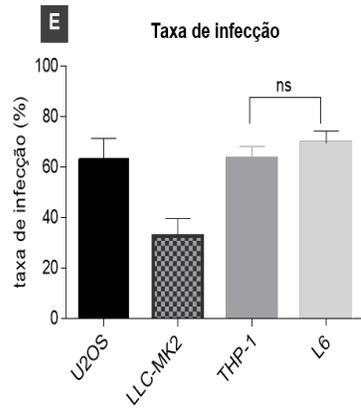
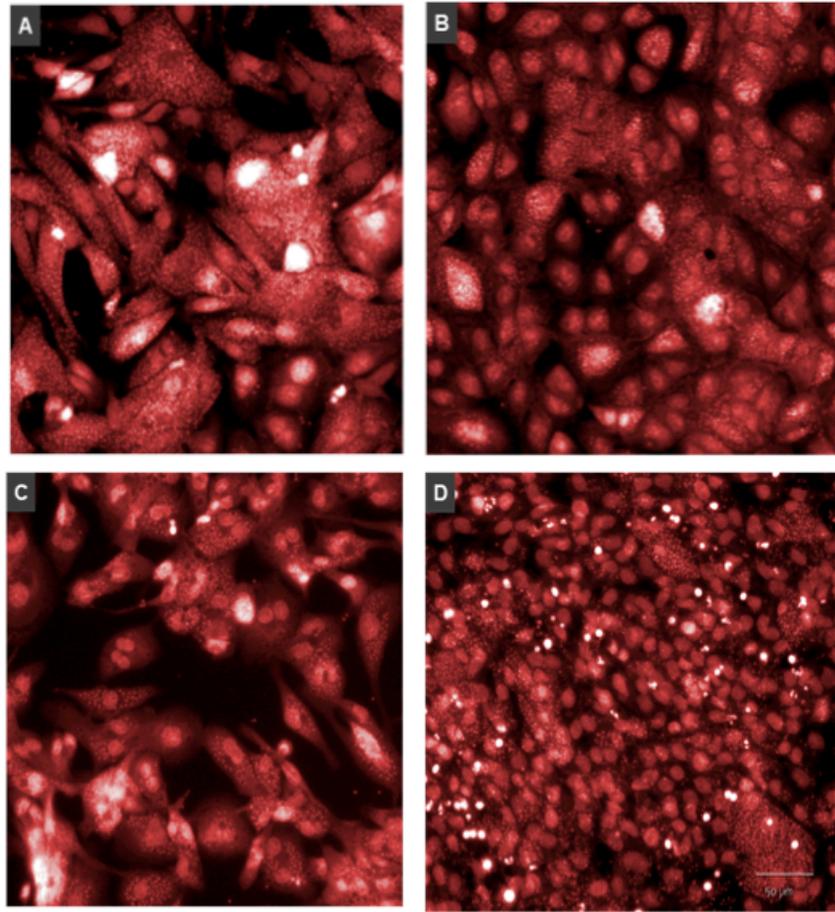


Figura 11. (Página anterior) Teste com diferentes linhagens de célula hospedeira. Imagens representativas de poços de controle negativo provenientes de linhagens celulares distintas infectadas com a cepa Y (estoque 1) de *T. cruzi*: **A)** U2OS; **B)** LLC-MK₂; **C)** THP-1; **D)** L6. Análises quantitativas revelam diferenças estatísticas entre parâmetros da: **E)** Taxa de infecção média (eixo Y); **F)** Número médio de amastigotas por célula infectada (eixo Y); **G)** Número total de células (eixo Y). Escala: 50 µm. ns: indica que não houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

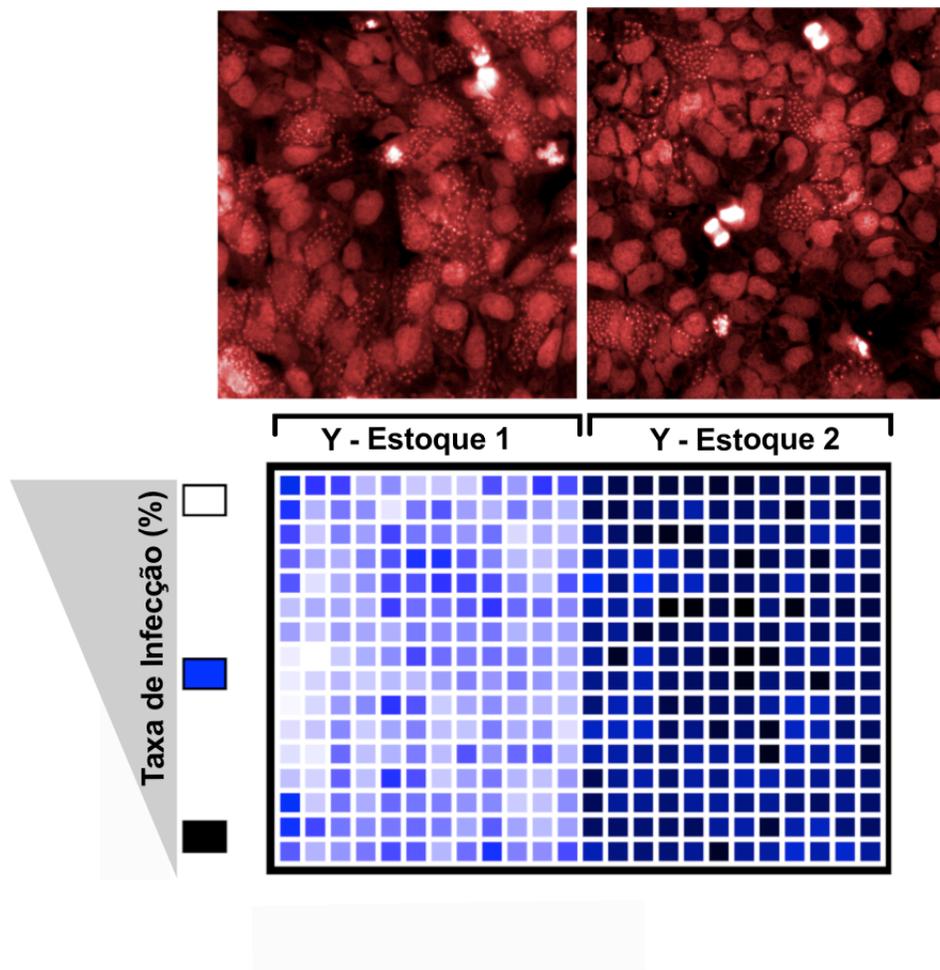


Figura 12. Diferença no perfil de infecção dos estoques 1 e 2 da cepa Y na célula U2OS em uma mesma microplaca de 384 poços. Parte superior mostra imagens representativas de poços com as células contendo parasitas dos estoques 1 e 2 da cepa Y após 96 h de infecção. Abaixo a nítida diferença nas densidades de taxa de infecção entre os estoques distribuídos na mesma microplaca de ensaio, mostrada em função de diferentes tonalidades de cores.

Avaliamos também qual dos dois estoques da cepa Y era mais adequado para o ensaio de alta vazão: o estoque 1 ou o 2. Os dois estoques apresentaram divergências em aspectos variados do ensaio: a densidade ideal para a Y (estoque 2) foi de $1,4 \times 10^6$ tripomastigotas/mL, enquanto para a Y (estoque 1) foi de $2,8 \times 10^5$ tripomastigotas/mL;

além disso a taxa de infecção e a taxa de replicação do estoque 1 foi estatisticamente mais elevada nas microplacas de ensaio - mesmo utilizando uma densidade mais reduzida –, enquanto os parasitas do estoque 2 apresentaram um padrão de IR mais baixo (**figura 12**), além de apresentar uma variabilidade maior entre os diferentes dias de infecção nas microplacas, como oscilação nas taxas de infecção e número de parasitas intracelulares entre as replicatas. Também foram constatadas diferenças em relação a susceptibilidade ao benznidazol entre os dois estoques da cepa Y, sendo que o estoque 1 mostrou-se mais susceptível a ação deste composto referência (EC_{50} para o estoque 1: $\sim 1,5 \mu\text{M}$; EC_{50} para o estoque 2: $\sim 20 \mu\text{M}$). Foi decidido utilizar os parasitas do estoque 1 para *screening* de bibliotecas maiores (como a MNHN), devido ao seu perfil de infecção mais alto e homogêneo – além de ser sensível ao BZL. Já os parasitas do estoque 2 foram utilizados para gerar o clone H10 (Y clH10), que foi utilizado nas triagens da biblioteca LOPAC e Pathogen Box e nos ensaios do estudo de resistência ao ravuconazol.

4.1.4. Avaliação da reprodutibilidade do ensaio de alto conteúdo

Após definidos os parâmetros biológicos do protocolo de triagem, a reprodutibilidade do ensaio foi medida ao avaliar curvas dose-resposta do composto benznidazol sobre a cepa Y (estoque 1) provenientes de cinco experimentos independentes, realizados seguindo o protocolo de 72 h. O valor médio de EC_{50} obtido foi de $1,65 \mu\text{M}$ ($\pm 0,19$) e o perfil coincidente das curvas confirmaram a consistência do ensaio (**figura 13**).

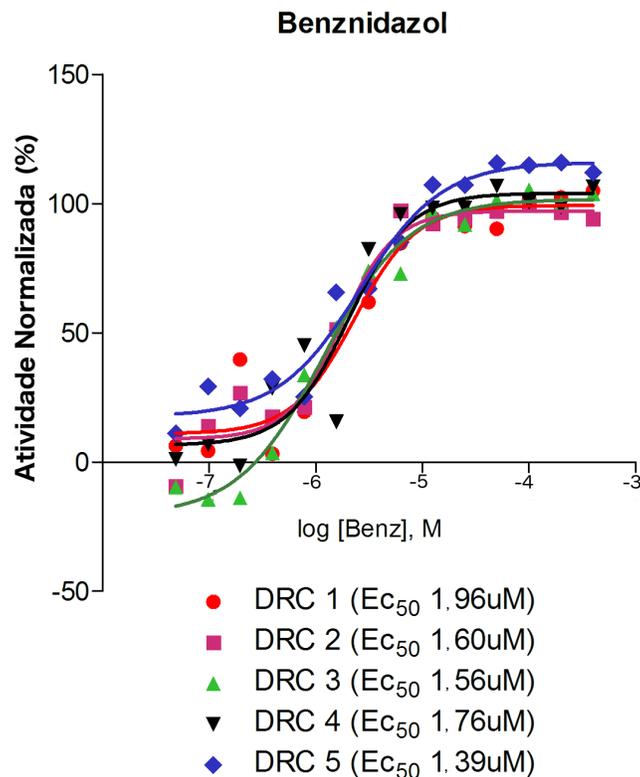


Figura 13. Compilação de curvas de atividade normalizada do composto referência benznidazol obtidas em diferentes dias de ensaio com a cepa Y de *T. cruzi* (estoque 1) infectando a célula U2OS corroboram a robustez do ensaio proposto. Eixo Y: atividade normalizada (em %); eixo X: Log da concentração do composto, em molar. Legenda: DRCn indica a curva dose-resposta de cada experimento (diferentes rodadas em dias distintos); valores de EC_{50} obtidos a partir de interpolação dos valores da curva.

4.1.5. *Scale-up* do protocolo triagem e avaliação

A robustez do protocolo do ensaio foi verificada ao comparar parâmetros gerais dos controles negativos de dois ensaios realizados em pequena e média escala (2 e 12 microplacas, respectivamente). O *scale-up* não afetou estatisticamente os principais fatores do ensaio, como a média da taxa de infecção, número médio de parasitas/célula e fator Z' médio; todavia a média do número total de células foi significativamente reduzida no experimento em maior escala (**tabela 7**), possivelmente devido à sensibilidade supramencionada da célula U2OS. Mesmo havendo uma redução na média do número geral de células hospedeiras entre os dois ensaios, a variação deste parâmetro (e dos demais avaliados) entre as microplacas do mesmo experimento foi

mínima. Mesmo assim se decidiu testar no máximo dez placas por rodada de experimento (incluindo controles), a fim de evitar grande variabilidade nos resultados finais. Após a conclusão dessa etapa de *scale-up*, este protocolo de triagem foi validado e começou a ser empregado no *screening* de bibliotecas. Um processo semelhante de validação foi empregado para o protocolo de 96 h, mas como se trata de um ensaio que apresenta menor variabilidade, compostos e bibliotecas menores já eram testados durante o processo de validação.

Tabela 7. Avaliação do aumento de escala sobre os principais fatores do ensaio de *T. cruzi*

Escala	Taxa de Infecção (%)	Número de Células †	Número de amastigotas/ célula	Z'
2 placas	65,4 ± 7,9	1.173 ± 230	5,3 ± 1,5	0,70 ± 0,03
12 placas	69,2 ± 8,1	871 ± 112	6,9 ± 1,7	0,68 ± 0,05

Dados referentes a médias dos controles negativos de cada placa ± desvio padrão após 96 h após adicionar o parasita. † dados significativamente diferentes ($p < 0,05$).

4.1.6. Padronização e validação do ensaio de alto conteúdo para diferentes cepas de *T. cruzi*

Conforme já descrito, as diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam grande variabilidade fenotípica em termos de infectividade *in vitro* (isto é, capacidade de reconhecer e infectar e células hospedeiras) e de crescimento (taxas de replicação intracelular) (35). Esta variabilidade pode ser conferida numa análise multiparamétrica da infecção *in vitro* (controles negativos – células infectadas não tratadas - e positivos – células não-infectadas) mostrados na **tabela 6** e na **figura 14**. Algumas cepas (Y, Sylvio X10/1) são altamente infectivas, com taxas de infecção superiores a 80% (nas condições testadas: protocolo de 96 h) e os números relativamente mais elevados de amastigotas intracelulares; por conseguinte estas cepas têm efeitos citopáticos mais pronunciados contra células hospedeiras, o que leva a uma redução na população nos poços de controle negativo. As cepas também exibem taxas variáveis de crescimento intracelular

(baseado em nossas observações em cultura *in vitro*), que, combinadas com o grau distinto de infectividade, podem influenciar na resposta a compostos, embora esta possibilidade ainda não tenha sido completamente explorada.

O ensaio proposto com as diferentes cepas de *T. cruzi* envolve ao menos um membro dos DTUs TcI – TcV e dois membros do TcVI (**tabela 3**). O protocolo do *screening* de compostos adaptado contra as diversas cepas de *T. cruzi* foi baseado no ensaio padronizado por nosso grupo para estudar e comparar o perfil de atividade dos compostos clássicos nitroheterocíclicos em relação aos inibidores da TcCYP51 contra um painel heterogêneo de cepas (206); algumas modificações foram realizadas nesta versão experimental:

- Com o intuito de uniformizar o tempo de exposição de 96 h dos compostos testados contra todas as linhagens de *T. cruzi* utilizadas no ensaio, a cepa representante do TcI Sylvio X1/10 foi escolhida para substituir a Dm28c (padronizada antes para um tempo total de incubação com compostos mais reduzido, de 72 h);
- As densidades para as cepas Sylvio X1/10 e Tula cl2 foram definidas empiricamente no esquema do ensaio (diversas densidades foram testadas no modelo de infecção e aquelas que geraram resultados mais homogêneos e consistentes no final do ensaio foram selecionadas), enquanto para as demais cepas foram utilizadas densidades previamente padronizadas em nosso grupo;
- A escolha das densidades ideais para cada cepa em particular considerou as condições do sistema 120 h após a infecção, observando os parâmetros: taxa de infecção, número médio de parasitas/célula hospedeira e número total de células hospedeiras U2OS para cada cepa;
- Ajustes finos nos blocos de análise do *software* Harmony foram feitos para cada cepa em particular, principalmente na etapa de *Find spots*. Os padrões de

tamanho e contraste mínimos e espaçamento entre os picos de intensidade de sinal dos *spots* variavam de acordo com a cepa, já que cada representante genotípico parece possuir um perfil distinto de replicação e diferenciação intracelular;

- A padronização final para cada cepa foi definida quando a taxa de infecção média era suficientemente distinta entre os controles positivo e negativo, com variações mínimas na microplaca de ensaio, resultando em um fator de qualidade $Z' > 0,3$ – também foi avaliada a variação do ensaio entre dias distintos de experimento.

Tabela 8. Dados multiparamétricos do perfil do ensaio com cepas distintas do *T. cruzi*.

Cepas	DTU	Taxa de Infecção (%)	Número total de células hospedeiras	Número de amastigotas/célula infectada
Sylvio X10/1	I	83 ± 12,0	585 ± 162,8	20 ± 4,2
Y	II	76 ± 2,0	535 ± 18,7	7 ± 0,02
ARMA13 cl1	III	45 ± 7,0	802 ± 30,5	6 ± 0,16
ERA cl2	IV	42 ± 3,0	1021 ± 45	2 ± 0,03
92-80 cl2	V	31 ± 1,0	1590 ± 34,6	2 ± 0,08
Tula cl2	VI	41 ± 7,0	1034 ± 122	8 ± 1,7
CL Brener	VI	26 ± 2,0	1387 ± 1,0	3 ± 0,04

Dados referem-se a média ± desvio padrão de parâmetros obtidos nos controles negativos de dois experimentos independentes.

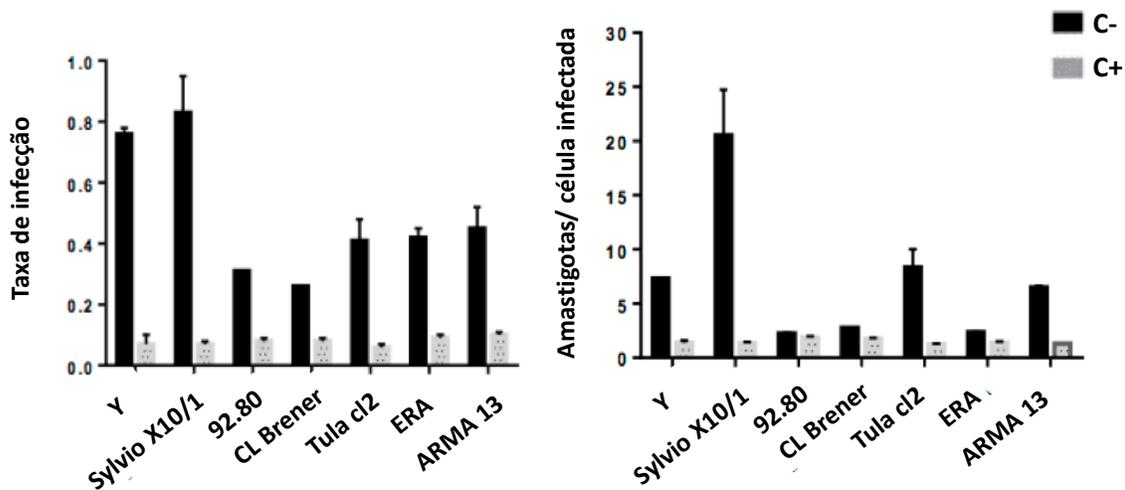


Figura 14. Variação no padrão de infecção das diferentes cepas de *T. cruzi*. Os gráficos indicam a variação da taxa de infecção (gráfico à esquerda: razão proporcional entre o número células infectadas pelo número de células totais) e do número médio de amastigotas por célula infectada (gráfico à direita), ambos no eixo Y. Os dados foram obtidos dos controles negativo (C-, barras pretas) e positivo (C+, barras cinzas) das placas de ensaio das diferentes cepas de *T. cruzi* (eixo X). Barras de erro indicam desvio padrão entre os dois experimentos independentes.

Após a padronização, com intuito de validar o ensaio proposto contra o painel de cepas, compostos referência foram testados contra os representantes de cada DTU. Foram escolhidos três compostos nitroheterocíclicos (benznidazol, nifurtimox e sulfona de fexinidazol) e quatro inibidores da via de biossíntese de ergosterol (posaconazol, ravuconazol, BS1246 e BS0967), reproduzindo resultados semelhantes aos publicados anteriormente por nosso grupo (206); foram constatadas algumas discrepâncias entre valores de potência e eficácia dos dados mostrados aqui e os publicados anteriormente, provavelmente devido ao processamentos de imagens distintos e variabilidade inerente de cada cepa em cultura. De maneira geral, os compostos nitroheterocíclicos foram mais eficazes (com maiores valores de atividade máxima) e relativamente potentes em todas as cepas testadas, exceto pelo valor de $EC_{50} > 10 \mu M$ da sulfona de fexinidazol calculado para Sylvio X10/1. Ao passo que os inibidores de CYP51, tanto azólicos como não-azólicos, foram mais potentes do que os nitroheterocíclicos em algumas cepas (Sylvio X10/1, Y, ARMA13 cl1, 92.80 cl2), porém com eficácia relativamente baixa (exceto para

a cepa Y), apresentando, enfim, inconstância na atividade contra o painel de cepas (Tabela 8). Conforme já discutido no artigo publicado por nós (206), vale ressaltar a importância de testar os compostos anti-*T. cruzi* em desenvolvimento contra um painel de cepas representativas, a fim de verificar a o espectro de atividade destes candidatos, no ponto de vista da potência e eficácia (222).

Tabela 9 Valores de atividade de compostos referência contra painel de cepa de *T. cruzi*. Dados referem a valor médio de EC₅₀, em micromolar e atividade máxima – entre parênteses – em %.

Compostos	Sylvio X10/1	Y	ARMA13 cl1	ERA cl2	92-80 cl2	CL Brener
Benznidazol	2,7 (100)	2,9 (93)	3,0 (98)	3,0 (102)	1,6 (112)	0,48 (111)
Nifurtimox	3,9 (96)	0,22 (94)	1,00 (102)	0,79 (98)	0,43 (103)	0,17 (108)
BS1246	0,06 (82)	0,03 (106)	0,03 (70)	ND (37)	0,26 (54)	0,04 (87)
BS0967	0,06 (73)	0,02 (109)	0,05 (73)	1,1 (61)	0,06 (83)	0,03 (88)
Sulf. de fexinidazol	16,0 (100)	3,05 (87)	1,90 (125)	4,7 (102)	3,8 (104)	1,2 (106)
Posaconazol	0,003 (73)	0,002 (91)	0,05 (71)	0,06 (60)	0,01 (65)	0,02 (86)
Ravuconazol	0,001 (89)	0,04 (102)	0,002 (66)	ND (26)	0,02 (53)	NT

ND indica que o valor não foi gerado a partir dos cálculos. NT indica que o composto não foi testado na respectiva cepa. Dados referem-se a valores médios de três experimentos independentes para Sylvio X10/1, Y e 92.80 e de dois experimentos independentes para as demais cepas.

4.2. Teste dos compostos *leads* do DNDi contra o painel de cepas de *T. cruzi*

Posteriormente à validação do ensaio, foram triados, utilizando este protocolo contra o painel de cepas de *T. cruzi*, 10 compostos (A – J) originados do programa de otimização de *leads* do DNDi. Estes compostos já obtiveram êxito em testes *in vitro* e foram quimicamente otimizados com foco na atividade anti-*T. cruzi* (um processo do

desenvolvimento de fármacos conhecido pelo termo em inglês *hit-to-lead optimization*). Os compostos foram enviados para teste contra o painel de cepas *in vitro* com a intenção de verificar se há um amplo espectro de ação dos mesmos, conforme preconiza o perfil de produto alvo para doença de Chagas, elaborado pelo próprio DNDi. Os resultados deste teste, juntamente com dados de outros colaboradores da organização, servirão de base para priorizar aqueles *leads* que podem avançar no processo de desenvolvimento, passando para testes *in vivo* e estudos de farmacocinética e farmacodinâmica (227). Os nomes, classes e estruturas químicas dos compostos *leads* foram omitidos por uma questão de propriedade intelectual.

O perfil de atividade de cada composto foi traçado e comparado com o do composto referência benznidazol (**figura 15**). Conforme esperado, o benznidazol foi eficaz contra todas as cepas triadas, atingindo uma atividade máxima de ao menos 95% e valores consistentes de EC_{50} na faixa decimal da concentração micromolar (**figura 16**). Dentre os *leads* testados, os compostos B e J exibiram o melhor perfil de atividade contra o painel de cepas e foram superiores ao benznidazol, tanto em termos de potência, com valores de EC_{50} variando entre 0,1 e 0,7 μ M, quanto eficácia, atingindo atividade de 100% contra todas as cepas testadas. Os demais *leads* testados mostraram-se, em média, com potência superior ao benznidazol, com exceção do composto G, cujo valor de EC_{50} variou de 3 a 15 μ M entre as cepas (**figura 16**).

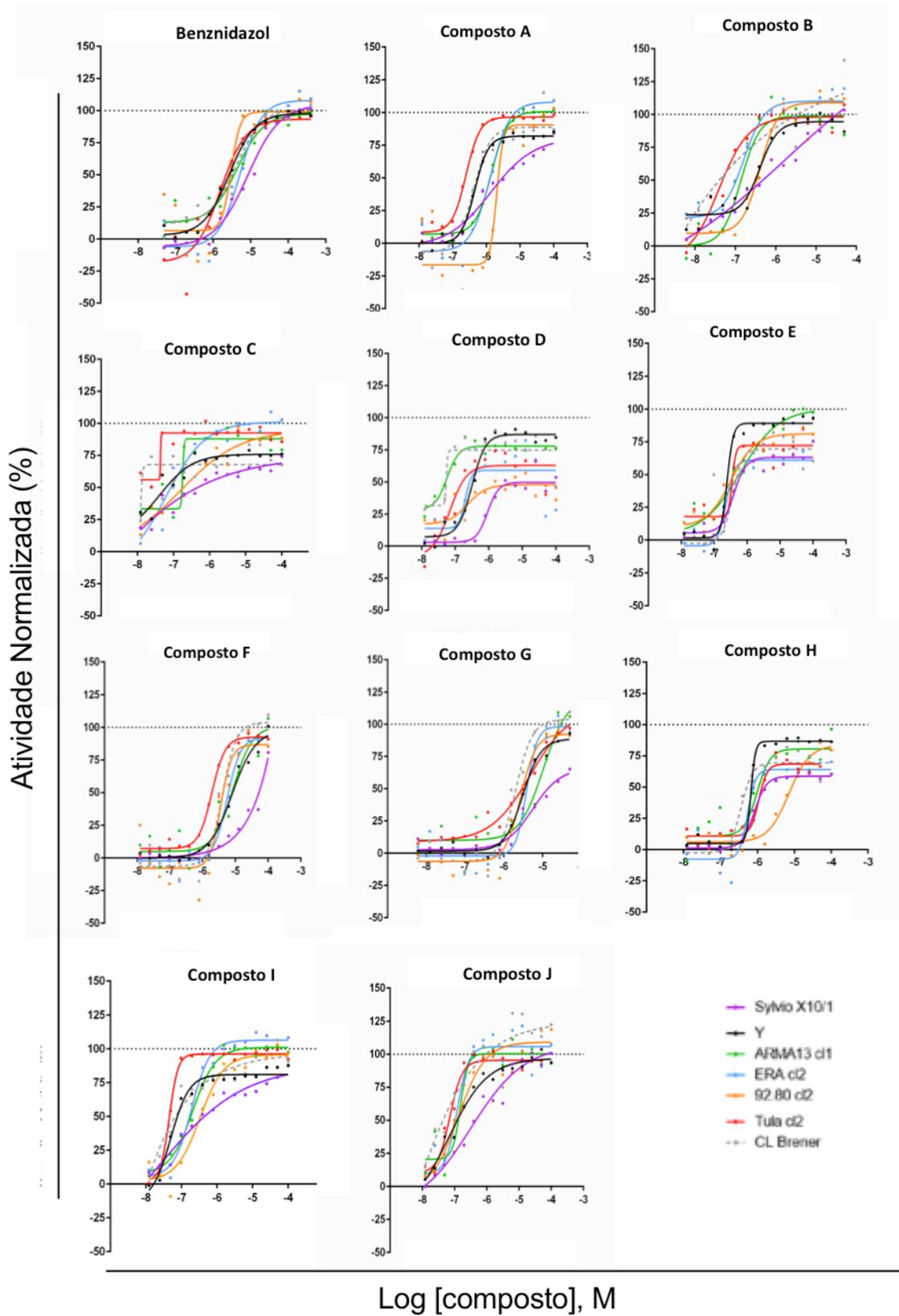


Figura 15. (Página anterior) Atividade anti-*T. cruzi* de compostos *lead* contra o painel de cepas. Atividade normalizada dos compostos benznidazol, A, B, C, D, E, F, G, H, I e J estão representadas nos gráficos. O eixo X indica o Log da concentração dos compostos (em molar), enquanto o eixo Y indica os valores de atividade normalizada (em %) contra o painel filogenético de cepas de *T. cruzi*, aqui representadas por diferentes cores das curvas: Sylvio X10/1 (roxo); Y (preto), ARMA13 cl1 (verde), ERA cl2 (azul), 92-80 cl2 (laranja), Tula cl2 (vermelho) e CL Brener (cinza). Pontos indicam valores médios de dois experimentos independentes.

A maioria dos compostos foi eficaz contra a maior parte (mas não todas) as cepas testadas – já os compostos C, D, E e H exibiram eficácia moderada (e relativamente variável) contra o painel de cepas. Aparentemente, a correlação estabelecida para os compostos nitroheterocíclicos entre infectividade e replicação da cepa com a menor atividade dos compostos pode ser constatada no perfil destes compostos *leads*. Os resultados plotados na **figura 17** permitem visualizar não só o perfil geral de uma série de compostos contra o painel de cepas, em termos de potência e eficácia, como também indica o padrão de variabilidade da resposta destes compostos (representado pelas barras de desvio dos pontos); neste caso o composto referência benznidazol ainda se mostrou mais consolidado em relação a sua atividade contra as cepas (menor desvio padrão em relação aos demais compostos).

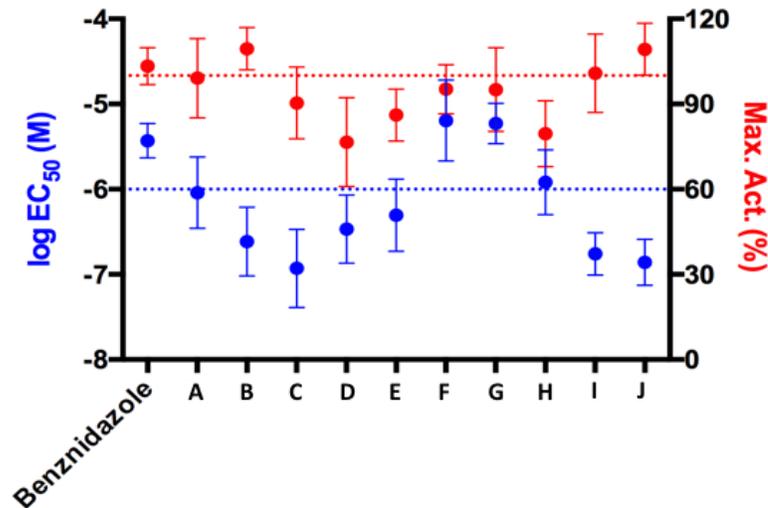


Figura 16. (Página anterior) Perfil geral da atividade dos compostos (potência e eficácia) frente ao painel de cepas de *T. cruzi*. Compostos estão identificados no eixo X. Os valores médios de potência e eficácia de cada composto contra as cepas distintas estão plotados no gráfico: a potência está expressa pelo Log EC₅₀s, em molar (pontos azuis – eixo Y esquerdo), enquanto a eficácia está representada pelos valores médios da atividade máxima dos compostos (Max. Act., em %, pontos vermelhos, eixo Y direito). Barras indicam o desvio padrão da média calculada a partir de todas as cepas testadas. A linha segmentada azul marca o valor de 1 µM no eixo Y esquerdo (EC₅₀), e a linha segmentada vermelha marca o valor de 100% (atividade). Dados obtidos de dois experimentos independentes para todas as cepas testadas.

4.3. Screening da biblioteca MNHN

4.3.1. Triagem primária e seleção de compostos *hits*

Após a padronização do ensaio, uma biblioteca contendo 1.604 amostras (1.476 compostos puros e 164 extratos naturais) foi triada com intuito de validar os protocolos de *screening* desenvolvidos e buscar candidatos com atividade anti-*T. cruzi* em potencial. As amostras da biblioteca MNHN foram triadas seguindo o protocolo de 72 h, sendo que todas as oito microplacas utilizadas (6 de ensaio + 2 de controle) foram consideradas aprovadas segundo nosso critério de qualidade ($Z' \geq 0,5$); a média do fator Z' obtida na triagem foi de $0,7 \pm 0,04$.

Com base nos valores de taxa celular do *screening*, de todas as amostras triadas, apenas 7,7% aparentaram ser tóxicas para a célula hospedeira, apresentando toxicidade superior a 50% (com base na redução da taxa celular – razão entre número de células no poço tratado e a média das células do controle negativo, células infectadas não-tratadas), nas concentrações testadas de 10 µg/mL (extratos) e 1,0 µg/mL (sintéticos) (**figura 17**).

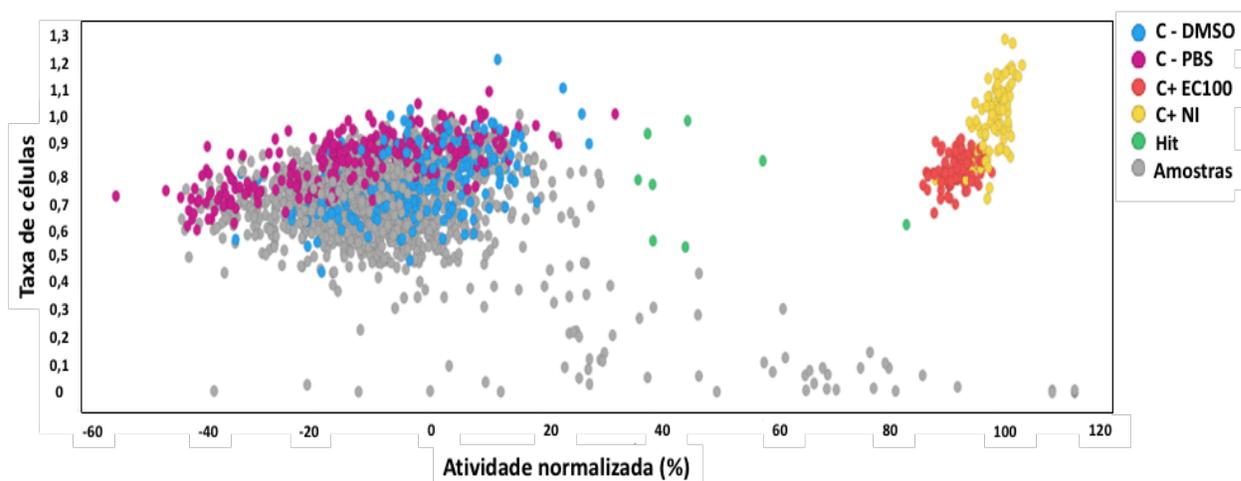


Figura 17. Triagem da biblioteca de compostos MNHN contra *T. cruzi*. Correlação entre taxa celular (eixo Y) e atividade normalizada (em %, eixo X). pontos azuis representam poços do controle negativo (DMSO 1%), pontos de cor magenta indicam poços de controle negativo sem o veículo DMSO (PBS 1%), pontos vermelhos indicam os poços do controle positivo tratados com benznidazol a 400 μ M (EC100), pontos amarelos representam poços do controle positivo contendo células não infectadas (NI), pontos verdes indicam os poços contendo as amostras selecionadas para triagem secundária (atividade aproximadamente 40% e taxa celular maior do que 0,5), demais amostras são representadas por pontos cinza.

Os *hits* foram selecionados como sendo as oito amostras mais ativas, com atividade normalizada de aproximadamente 40%, exibindo, porém, uma toxicidade celular igual ou inferior a 50%. A amostra que mais se destacou na triagem primária foi a 0459, com atividade normalizada superior a 80%, apesar da redução de aproximadamente 40% da taxa celular (**tabela 9**).

A inibição da infecção causada por estas amostras foi conferida através da inspeção visual das imagens geradas a partir de cada um dos poços testados. Nas imagens representativas de pelo menos quatro amostras (0459, 1238, 1409 e 1412), não foi possível detectar a presença de amastigotas intracelulares (**figura 18**).

Todos os *hits* foram provenientes da porção de compostos puros da biblioteca (em sua maioria, compostos sintéticos), sendo que nenhuma amostra da extratoteca apresentou atividade satisfatória de inibição do *T. cruzi*. A seleção das amostras desta triagem resultou em uma taxa de *hits* de 0,48% (**figura 17**). Estes hits foram selecionados para teste em dose-resposta (ensaio confirmatório) no esquema do protocolo de 96 h.

Tabela 10. Dados dos hits selecionados no screening primário da biblioteca MNHN: atividade normalizada (%) e taxa celular. Amostras foram testadas em concentração única de 1,0 µg/mL.

Amostra	Atividade normalizada (%)	Taxa celular
0290	39,6	0,55
0302	39,6	0,76
0303	37	0,77
0459	84,4	0,61
0638	45,8	0,99
1238	45,4	0,53
1409	60	0,84
1412	38,7	0,94

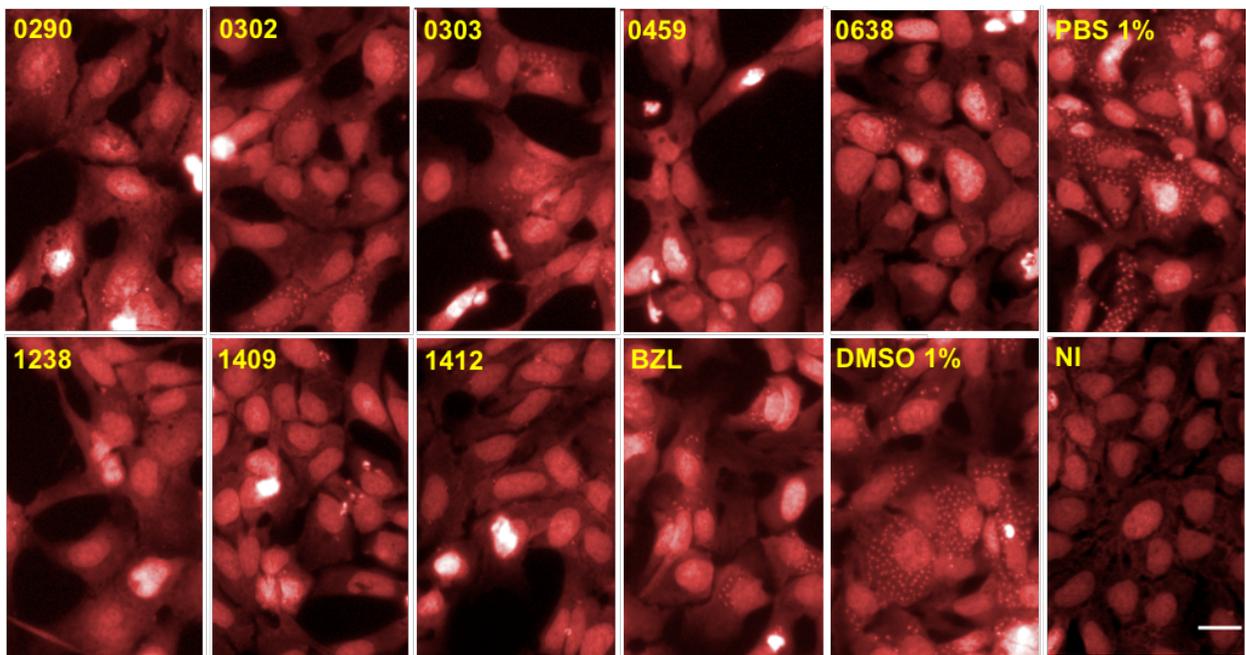


Figura 18. Imagens representativas dos poços contendo compostos hits da triagem da biblioteca MNHN. Imagens revelam que os compostos selecionados (0290, 0302, 0303, 0459, 0638, 1238, 1409 e 1412) inibem parcial ou totalmente o crescimento de amastigotas intracelulares na concentração testada de 1,0 µg/mL (ou 3,8µM). Imagens dos poços dos controles negativo (PBS 1% e DMSO 1%) e positivo (não-infectado – NI) também estão representadas, além do poço tratado com benznidazol (BZL) a 1,0 µg/mL. Escala: 25 µm.

4.3.2. Ensaio confirmatório

O ensaio confirmatório permite a avaliação da atividade das amostras, em diferentes concentrações, sobre o sistema parasita-célula por um período mais longo (protocolo de 96 h), podendo trazer indícios de aumento da atividade (ou de perda de seletividade); ainda, o fato das amostras não serem introduzidas no sistema simultaneamente ao plaqueamento das células (célula de mamífero + parasitas, protocolo 1) permite avaliar a ação dos *hits* diretamente sobre os parasitas intracelulares, enquanto no esquema do ensaio primário as amostras poderiam agir exclusivamente sobre os mecanismos de invasão celular ou sobre a forma de tripomastigota, exclusivamente (detalhes dos protocolos nos **esquemas 3 e 4** da seção **3.5.**).

Os valores de EC_{50} , CC_{50} e atividade máxima dos *hits* foram calculados a partir das curvas sigmoide de 10 pontos formadas a partir dos dados de atividade normalizada e taxa celular do ensaio secundário (**tabela 10**).

Tabela 11. Dados do ensaio confirmatório dos hits da MNHN. valores de EC₅₀ (em µg/mL), valores de CC₅₀ (em µg/mL), atividade máxima (em %) e índice de seletividade.

Amostra	EC ₅₀ , (µg/mL)	CC ₅₀ , (µg/mL)	Atividade Máxima (%)	Índice de Seletividade
Benznidazol	0,9 ± 0,1**	ND	102,5	> 111
0290	0,5 ± 0,1	1,6*	78,6	3,1
0302	0,8 ± 0,09	-	45	> 1,2
0303	-	-	26,6	-
0459	-	-	16,9	-
0638	-	-	22	-
1238	0,5 ± 0,01	0,7 ± 0,05	73	1,4
1409	0,07 ± 0,05	-	81	> 14,3
1412	1,0*	-	49	>1,0

*Indica que o valor foi obtido em um único experimento. Demais dados referem-se a média de 2 experimentos independentes ± desvio padrão. ** valor equivalente a 3,46 ± 0,4 µM.

Índice de Seletividade (SI): razão entre o valor de CC₅₀ e o valor de EC₅₀ (CC₅₀/ EC₅₀). Quando o valor de CC₅₀ não é gerado através da interpolação com valores da curva, a concentração mais alta testada é utilizada para estimar o valor mínimo de SI: (Max [amostra] /EC₅₀). Atividade máxima (em %, MA) refere-se ao valor de atividade normalizada plotada no ponto mais alto da curva sigmoide dose-resposta.

O critério de confirmação de *hits* foi estabelecido como: a apresentação de pelo menos um ponto da curva igual ou superior a 40% de atividade normalizada (**tabela 10**). Cinco amostras dos oito *hits* selecionados foram confirmadas segundo este critério (62,5% de confirmação de *hits*), das quais três apresentaram resultados eminentes, foram eles: 0290 (EC₅₀: 0,52 µg/mL, MA: 78,63%); 1238 (EC₅₀: 0,56 µg/mL, MA: 73,07%) e 1409 (EC₅₀: 0,07 µg/mL, MA: 80,91%); os demais *hits* confirmados apresentaram MA baixo ou mediano. Curiosamente, a atividade da amostra 0459 não se confirmou (nem sequer foi obtido valor de EC₅₀, já que a sua atividade antiparasitária máxima foi de

16,9%), embora tenha apresentado o maior valor de atividade normalizada no *screening* primário. Possivelmente esta discrepância deve estar associada ao fato da amostra agir sobre as etapas de entrada do tripomastigota na célula hospedeira (quer seja no processo de adesão, reconhecimento, invasão, formação do vacúolo parasitóforo ou diferenciação), impedindo a continuidade da infecção; estas etapas não são afetadas diretamente durante o ensaio confirmatório, seguindo o protocolo de 96 h (com exceção de reinfecções pós-lise das primeiras células invadidas); a amostra ainda pode ter exibido uma atividade acentuada contra a forma tripomastigota do parasita, eliminando os organismos infectantes antes mesmo da invasão das células hospedeiras. Esta explicação é conjectural e necessita de estudos direcionados para melhor esclarecimento. Deste modo, é extremamente relevante discutir a possibilidade de interferência que um dado protocolo pode causar na seleção de compostos; deve-se ponderar se a praticidade metodológica adotada não afeta diretamente a seleção de amostras, elevando a quantidade de falsos-positivos ou deixando de selecionar compostos com potencial. Diante do exposto, decidiu-se trabalhar sempre com o protocolo 1 (96 h de exposição aos compostos).

4.3.3. O composto *hit* MNHN-1409: um análogo da auraquina D

O *hit* 1409 é uma molécula derivada do composto natural auraquina D. Isoladas originalmente de culturas de mixobactéria *Stigmatella aurantiaca*, as auraquinas formam uma classe química de alcaloides quinolínicos isoprenóides, caracterizada pelo grupo quinolínico substituído na posição 3 ou 4 por uma cadeia fernesil (228). Algumas auraquinas foram descritas com atividade inibitória contra bactérias gram-positivas, algumas espécies de fungos, e contra os protozoários *P. falciparum* e *T. brucei gambiense* (228–230). O mecanismo de ação destes compostos está associado à inibição da cadeia respiratória, agindo, por exemplo, sobre as oxidases bacterianas citocromo *bd* e *bo* de *Escherichia coli* e *Mycobacterium smegmatis* (231,232); a auraquina D mimetiza o ubiquinol, uma coenzima que atua como carreador de elétrons na membrana mitocondrial interna. Além do composto 1409, o *hit* 1412 também é uma auraquina, porém sua atividade foi considerada modesta nos ensaios confirmatórios;

ainda assim, levando em conta o enriquecimento dessa classe química na seleção dos hits desta biblioteca, decidimos localizar e testar as demais auraquinas presentes na biblioteca MNHN (e que não foram selecionadas como *hits*) e testá-las em dose resposta no ensaio de 96 h contra *T. cruzi* a fim de comparar os resultados com a 1409. Dos 12 compostos testados, a 1409 foi a única que apresentou novamente atividade satisfatória contra o amastigota de *T. cruzi*; as demais amostras apresentaram pouca (MA < 30%) ou nenhuma atividade nas concentrações testadas, inclusive o 1412 (MA < 10%) (**tabela 11**). Apesar de alguns estudos mostrarem toxicidade das auraquinas contra células humanas *in vitro* (228,230), não encontramos valores preditivos significativos para os análogos testados, com exceção do 1415 (taxa celular < 0,5); entretanto, estudos complementares devem ser realizados utilizando soluções mais concentradas destas amostras.

Curiosamente, o composto natural auraquina D (MNHN-1415) apresentou uma atividade relativamente baixa contra *T. cruzi* no *screening* primário (MA = 28%) quando comparada com a de seu análogo 1409 (MA = 60%), contrastando com a potência quatro vezes superior da auraquina D em relação a detectada no análogo 1409 em ensaios *in vitro* contra *T. brucei* (228). Esse fato pode estar associado com a estrutura química da 1409, podendo promover maior afinidade com na interação com a molécula alvo ou favorecer a ação sobre outras estruturas de *T. cruzi* ou da célula hospedeira (ação *off-target*).

Tabela 12. Dados referentes aos testes com compostos análogos de auroquina D. Estruturas químicas enviadas pelos fornecedores da biblioteca valores de atividade normalizada (em %) e taxa celular extraídos da triagem primária; valores de EC₅₀ (em µg/mL) resultantes do teste em dose-resposta.

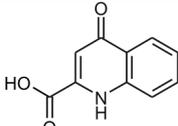
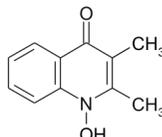
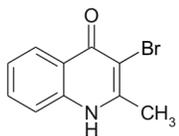
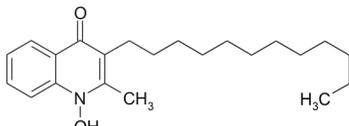
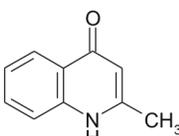
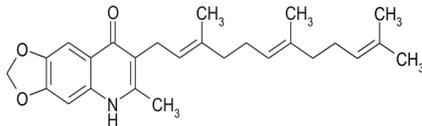
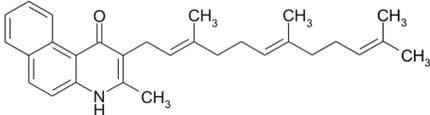
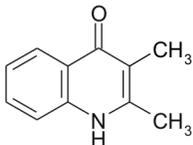
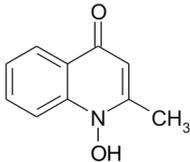
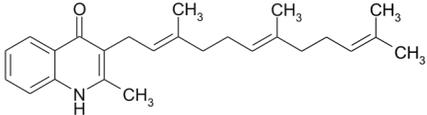
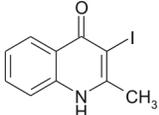
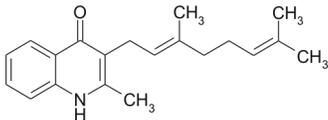
Compostos análogos a auroquina D	Estrutura química	Screening primário		Teste em dose resposta (96 h)
		Atividade normalizada (%)	Taxa celular	EC ₅₀ (µg/mL)
0472		1,6	0,61	ND
1391		-25	0,60	ND
1402		-21,7	0,77	ND
1412		38,7	0,93	ND
1393		-28,5	0,59	ND
1423		18,7	0,84	ND

Tabela 11. Continuação.

Compostos análogos a auraquina D	Estrutura química	Screening primário		Teste em dose resposta (96 h)
		Atividade normalizada (%)	Taxa celular	EC ₅₀ (µg/mL)
1395		30	0,79	ND
1396		-14,5	0,75	ND
1406		-11	0,76	ND
1415		27,8	0,46	ND
1407		-16,6	0,76	ND
1409		60	0,84	0,10 ± 0,01

ND indica que não foi possível gerar o valor a partir dos cálculos de interpolação

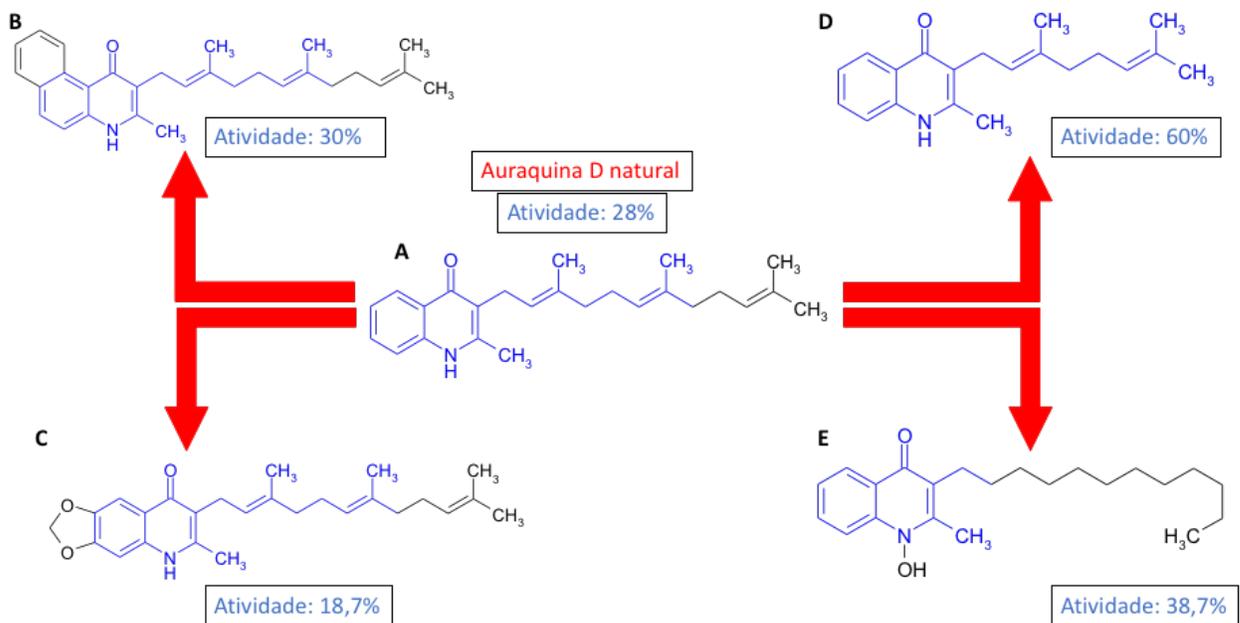
4.3.4. Estudo preliminar da relação estrutura atividade dos análogos de auraquina D

Com as estruturas químicas dos análogos da auraquina D disponíveis, realizamos um estudo simplificado de relação estrutura atividade a partir dos dados da triagem. Conforme mostrado no **esquema 5**, substituições nas cadeias e nos anéis do grupo quinolínico da auraquina D natural afetam a atividade contra *T. cruzi*. Os ganhos de atividade mais significativos parecem estar mais associados com a alteração nos comprimentos das cadeias substituídas do que em relação ao anel aromático, tanto substituições de cadeia com comprimento maior (MNHN-1412, + 11%, **esquema 5E**) como menor (MNHN-1409, + 32%, **esquema 5D**) resultaram em um ganho significativo na atividade dos análogos, sendo estes os análogos selecionados como compostos *hits*. A substituição pela cadeia geranil (2,6-dimetilocta-2,6-dieno) foi a que gerou o aumento mais substancial da atividade em relação a auriquina D, tendo mais do que o dobro de eficácia. Já as modificações nos ciclos aromáticos do grupo quinolínico trouxeram pouco ganho (MNHN-1395, +2%, **esquema 5B**) ou até perda de atividade (MNHN-1423, -9%, **esquema 5C**), quando comparados com o perfil da molécula natura (MNHN-1415, **esquema 5A**). Os dados de atividade dos demais compostos apresentados na **tabela 12** corroboram a hipótese do aumento da atividade associada a substituições de cadeias na posição 2 do anel quinolínico.

Alterações como a inclusão da fenila conjugada na estrutura 1395 (**esquema 5B**) pode aumentar a hidrofobicidade e provocar modificações da ressonância eletrônica. A ressonância do farmacóforo também é afetada nas modificações realizadas nas estruturas 1423 (grupo 1,3 dioxolo, **esquema 5C**) e 1412 (hidroxila, **esquema 5E**). Os grupos hidroxila e dioxolo, presentes respectivamente em 1412 e 1423, são considerados aceptores de ligações de hidrogênio, tendendo ao aumento de interações hidrofílicas das amostras. A mudança da cadeia carbônica insaturada para alquílica na estrutura do 1412 (**esquema 5E**), tende a aumentar a flexibilidade conformacional e a lipofilicidade da molécula, o que pode influenciar na permeabilidade deste composto em membranas proteicas e interações hidrofóbicas com enzimas. Com exceção da superioridade do análogo geranil (1409) em relação a auraquina D natural (1415), os dados de relação

estrutura atividade são compatíveis com a tendência observada em outros testes antiparasitários (228). Estudos adicionais são requeridos para elucidar mais detalhadamente o motivo do aumento da atividade das alterações nas cadeias destes compostos análogos.

Uma publicação recente ressaltou que diversos análogos de auraquina D foram sintetizados após a descoberta dos efeitos anti-*T. brucei*, no entanto nenhum desses compostos derivados apresentou atividade superior ao da molécula natural para prosseguir no processo de desenvolvimento do composto (233). Portanto, a descoberta da atividade da 1409, um análogo da auraquina D, contra *T. cruzi* apresenta uma contribuição inédita importante na exploração desta classe de compostos contra tripanossomatídeos. Estudos mais profundos serão feitos utilizando concentrações maiores do composto, visando elucidar a ação sobre a atividade mitocondrial de *T. cruzi* e seletividade sobre atividade em células humanas.



Esquema 5. (Página anterior) Aparente relação estrutura atividade (SAR) traçada a partir da estrutura da auroquina D natural, de seus compostos derivados e suas relativas atividades anti-*T.cruzi*. **A.** Estrutura química da auroquina D natural (MNHN-1415), caracterizada pelo grupo quinolínico e a cadeia insaturada (3,7,11-trimetildodeca-2,6,10-trienil) na posição 3 do farmacóforo, atividade de ~28% foi detectada na triagem primária da biblioteca MNHN; **B.** estrutura da MNHN-1395, mantém a cadeia carbônica ramificada insaturada na posição 3 do farmacóforo e inclusão de fenila conjugada na posição 6 do grupo quinolínico, atividade de ~30%; **C.** estrutura da MNHN-1423, mantém a cadeia carbônica ramificada insaturada na posição 3 do farmacóforo e inclusão de grupo 1,3 dioxolano conjugado na posição 7 do grupo quinolínico, atividade de 19%; **D.** estrutura da MNHN-1409, substituída com uma cadeia geranyl (em destaque na caixa vermelha), atividade de ~ 60%; **E.** estrutura da MNHN-1412, a cadeia carbônica ramificada insaturada na posição 3 do farmacóforo foi substituída por uma cadeia alquila não ramificada (n-dodecano) e inclusão de hidroxila na amina secundária do grupo quinolínico, atividade de 40%. Valores de atividade destacados nos análogos referem-se ao ganho ou perda de atividade, em relação a atividade obtida com o composto natural A.

Parte II: Comparação de diferentes cepas de *T. cruzi* e linhagens células hospedeiras e nos ensaios de alto conteúdo: triagem das bibliotecas LOPAC e *Pathogen Box*

4.4. Influência de diferentes células hospedeiras HCS: triagem da biblioteca LOPAC

4.4.1 Escolha das células e avaliações multiparamétricas dos diferentes sistemas parasita-célula hospedeira no ensaio de alto conteúdo

Quatro linhagens celulares de mamífero foram infectadas com *T. cruzi* (YclH10) e submetidas à triagem da mesma biblioteca de compostos farmacologicamente ativos (biblioteca LOPAC) a fim de verificar o impacto do uso de células hospedeiras distintas na seleção de compostos em triagens de alto conteúdo contra *T. cruzi* e, selecionar compostos com atividade mais ampla sobre as diferentes linhagens infectadas. As linhagens celulares utilizadas foram U2OS, THP-1, VERO e L6; essas linhagens foram escolhidas com base na aplicabilidade em ensaios baseados em imagens. Conforme descrito na **parte I**, padronizamos o ensaio de alto conteúdo para diversas células hospedeiras, apesar de termos selecionado a U2OS como célula hospedeira padrão

pelas características já discutidas anteriormente. Em termos de cultura *in vitro*, todas as linhagens celulares foram ajustadas às condições de cultura básica de THP-1 - porque as modificações no protocolo de cultura THP-1 seriam mais críticas para o desempenho do ensaio com estas células. O meio de cultura RPMI com 20% de concentração de FBS foi utilizado para todas as células hospedeiras de mamíferos. Como o estudo focou na variação da infecção e susceptibilidade aos compostos das diferentes células hospedeiras, utilizou-se um clone de cepa Y (gerado por diluição limitante, clH10), minimizando assim a variação de padrão de infecção recorrente em população não-clonal de parasitas cultivados *in vitro*.

Diferentes densidades celulares foram testadas para cada linhagem celular (dados não mostrados) para obter a confluência ideal após 120 h de infecção parasitária. No entanto, o tempo distinto de duplicação de células e a resposta variável à progressão da infecção renderam um número de células final dissimilar em cada sistema celular hospedeiro, variando de 550 células no sistema THP-1 para 2.852 em VERO, enquanto valores intermediários de 1.145 e 2.202 células foram obtidos para U2OS e L6, respectivamente (**tabela 12**). Uma imagem típica de cada sistema de célula hospedeira infectada após a padronização é mostrada na **figura 19**. Apesar do número total de células entre as linhagens VERO e L6 serem próximas, e considerando que foram infectadas sob o mesmo MOI (densidade de tripomastigotas adicionados pelo número de célula hospedeira semeada), a média da taxa de infecção (IR) para VERO (34,6%) foi pelo menos 60% inferior à calculada para L6 (84,9%). Os padrões de infecção ficam ainda mais díspares se o índice de infectividade (IIF, taxa de infecção normalizada em função do MOI utilizado) for avaliado; o sistema da célula THP-1-parasita ranqueou o IIF mais alto (19,1), já que mesmo sob um MOI reduzido atingiu parâmetros de infecção mais elevados em relação aos demais sistemas, proporcionalmente (**tabela 12**). Outra diferença explícita pode ser detectada para o número de parasitas/célula infectada, pois o resultado para linhagem L6 (13,3) é mais do que 7 vezes o número atingido pelas células VERO (1,8); o valor associado a THP-1 também foi relativamente alto (12,6), enquanto uma razão moderada pode ser observada para células U2OS (5,24). Resultados semelhantes são observados para o número total de amastigotas no poço, no entanto, o número para THP-1 é significativamente menor como consequência do

menor número total de células hospedeiras em comparação com as demais linhagens (**tabela 12**). A variabilidade intrínseca do sistema e as particularidades da linhagem celular - como diferentes tempos de duplicação, sensibilidade distinta à infecção por parasita/exposição ao DMSO – estão envolvidas na heterogeneidade dos ensaios de alto conteúdo com as diferentes células hospedeiras. A discrepância no número total de células, muito reduzido da linhagem THP-1 (550 células) em relação às outras linhagens celulares (~ 2.850 células na VERO) se dá, principalmente, porque as linhagens de células monocíticas, como a THP-1, param de replicar depois da diferenciação em células tipo macrófagos (234), enquanto as demais células utilizadas, como a VERO, se dividem aproximadamente a cada 24 h (235). As outras linhagens replicativas, U2OS e L6, também apresentaram número total de células relativamente menor, quando comparadas às células VERO, provavelmente devido a efeitos lesivos causados pelas maiores taxas de infecção, quando comparados com os controles não infectados (NI, dados não mostrados).

Um procedimento de aquisição padrão de quatro imagens/poço foi usado para este ensaio (para efeito comparativo). Como a entrada de células de *T. cruzi* nas células THP-1 diferenciadas deve ocorrer tanto passivamente (fagocitose do parasita) quanto ativamente (invasão de células THP-1 por tripomastigotas), o MOI usado para esta linhagem foi de 1/5 da relação usada para as outras linhagens celulares, ainda assim, a THP-1 produziu um IIF superior. Além disso, a cepa Y de *T. cruzi* é classificada como altamente macrofagotrópica em vez de miotrópica (33–35). Portanto, a invasão *in vitro* de uma célula semelhante a um macrófago por esta cepa poderia ser favorecida em comparação com as outras linhagens. Além da heterogeneidade observada no padrão de infecção entre as células hospedeiras, a variabilidade intrínseca de cada linhagem no ensaio de alto conteúdo (ou seja, o desvio dentro da placa de 384 poços) é um parâmetro essencial a ser avaliado em protocolos de triagem de alto conteúdo.

Tabela 13. Parâmetros gerais de *screening* de alto conteúdo produzidos pela infecção por cepa de Y de *T. cruzi* com diferentes linhagens de células hospedeiras.

	MOI	IR [%]*	Número de células	Parasita/célula inf.	Número de amastigotas	Z'
U2OS	20	51,6 ± 2,8 (2,6)	1.145 ± 130	5,24 ± 0,74	6.053 ± 574	0.5
THP-1	4	76,5 ± 3,7 (19,1)	550 ± 15	12,6 ± 1,10	4.131 ± 638	0.7
VERO	20	34,6 ± 4 (1,7)	2.852 ± 72	1,83 ± 0,40	5.191 ± 951	0.4
L6	20	85 ± 3,3 (4,2)	2.202 ± 212	13,3 ± 0,41	13.970 ± 1.415	0.8

*IR: taxa de infecção; entre parênteses está indicado o índice de infectividade (IIF): porcentagem de células infectadas/MOI. Valores indicam média ± desvio padrão de experimentos realizados em quadruplicata.

Os *heatmaps* revelam a variabilidade da IR e do número de células em cada linhagem celular infectada ao longo de toda a placa de 384 poços, tratadas apenas com DMSO 1% (colunas e linhas das extremidades não foram utilizadas) (**figura 19**). Os valores de IR mais consistente e o mais variável foram atribuídos a L6 (CV: 0,07) e VERO (CV: 0,18), respectivamente; observou-se a tendência inversa em relação a variação do número de células, uma vez que a menor variação foi gerada pela VERO (CV: 0,07) e a mais alta para L6 (CV: 0,12).

Sabendo que o fator Z', que avalia a qualidade dos ensaios de *screening*, depende essencialmente das diferenças médias entre valores dos controles positivos e negativos e da variabilidade dentro de cada um dos controles, é natural que o ensaio com as células VERO-parasita apresentou um fator Z' moderado, enquanto o das outras linhagens celulares apresentaram valores considerados excelentes para ensaios de alto conteúdo. Embora o controle de qualidade de ensaios de alta performance considere como critério de seleção apenas experimentos cujos valores de fator Z' > 0,4 (excelentes), os ensaios de qualidade moderada (0,2 < fator Z' < 0,4) são geralmente aceitos no caso de experimentos fenotípicos mais complexos (236).

Uma consequência direta de um IR superior, se pouco variável em toda a placa de ensaio, é a geração de fator Z' de alto padrão, indicando a boa confiança estatística

do ensaio e resultados de triagem, que implica a seleção de compostos com atividade desconhecida, estatisticamente confiáveis.

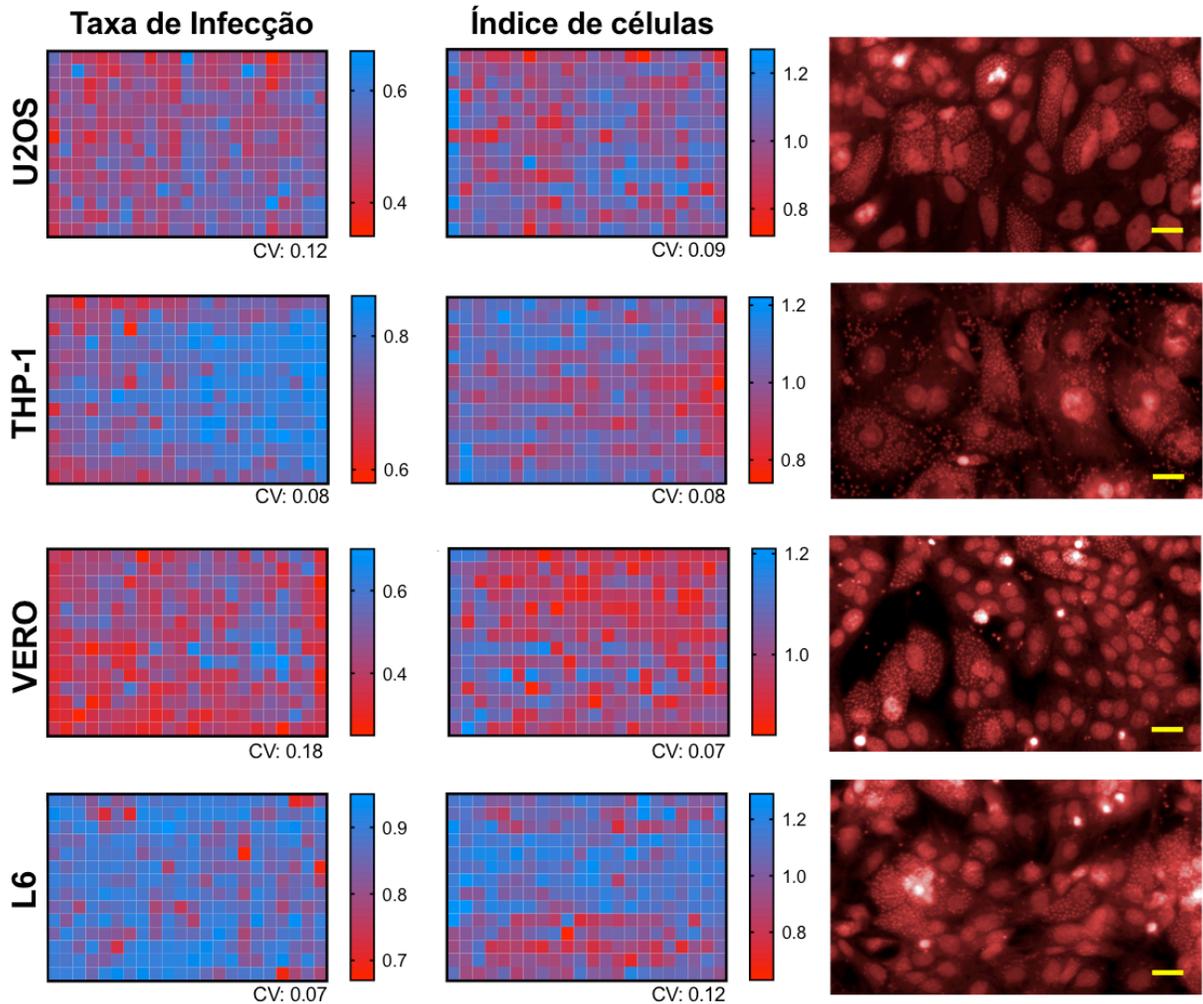


Figura 19. Variação de parâmetros analisados em diferentes células hospedeiras infectadas com *T. cruzi* em microplacas de 384 poços. Os *heatmaps* do painel esquerdo indicam os valores da taxa de infecção ao longo da microplaca, o painel central mostra variabilidade no número de células para diferentes células hospedeiras - índice celular definido como a relação entre o número total de células no poço pelo número médio de células na microplaca inteira. O gradiente de cor é indicado pela barra do lado direito (vermelho: valores baixos e azul: valores altos). CV indica o coeficiente de variação (relação entre desvio padrão e a média dos valores representados). As imagens representativas da infecção das células hospedeiras são mostradas na coluna do lado direito. Barra de escala: 25 μ m.

O fator Z' inferior do ensaio com a célula VERO pode ser atribuído não apenas aos seus parâmetros de infectividade relativamente baixos, mas também à variabilidade interna da infecção nos controles das placas de ensaio (**figura 20**). Proporcional ao grau do fator Z' , uma janela de separação entre pontos positivos (pontos inferiores do gráfico)

e controles negativos (pontos superiores do gráfico) do parâmetro IR pode ser observada na **figura 20**; quanto maior o fator Z' associado a um sistema de linhagem celular, maior é a diferença no espaço gráfico entre seus pontos de controle positivos e negativos. Além disso, a variação interna dentro de cada conjunto de controle, aqui representada pela dispersão dos pontos no eixo Y (**figura 20**) também influencia o cálculo do fator Z' ; em geral, diferentes sistemas de células hospedeiras apresentaram variação mínima na detecção de IR de controle positivo (falso positivo/detecção de detritos celulares), com variação média de 0,006% entre as linhagens; no entanto, os valores do controle IR de controle negativo atingiram uma variação de ~25% (VERO) até ~40% (U2OS e THP-1).

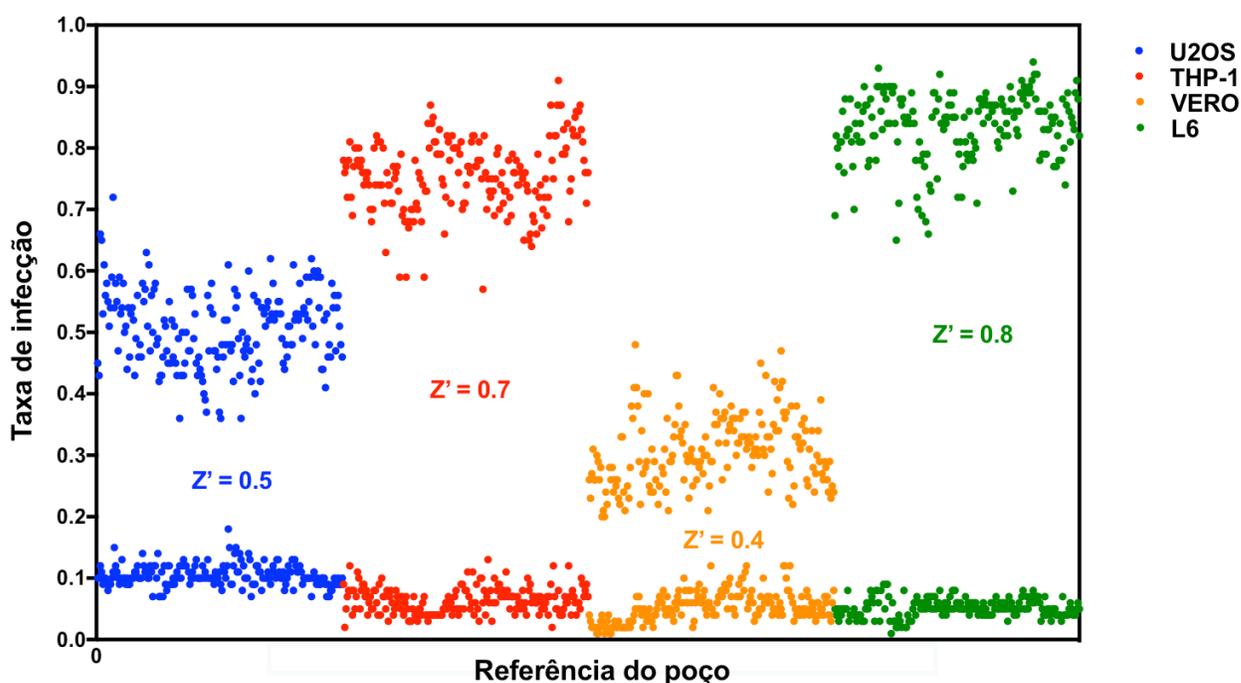


Figura 20. Distribuição dos pontos dos controles negativo e positivo da triagem da biblioteca LOPAC1280 das diferentes células hospedeiras infectadas com cepa Y de *T. cruzi*. U2OS (pontos azuis), THP-1 (pontos vermelhos), VERO (pontos amarelos) e L6 (pontos verdes). Eixo X: valores de taxa de infecção para cada poço controle (sinal de infecção aparente detectada pelo *software* no controle positivo – NI); eixo Y: referência do poço nas microplacas de ensaio. Dados plotados a partir do controle de seis microplacas de ensaio utilizada na (quatro contendo compostos da biblioteca + duas com as curvas dose-resposta controle).

Os compostos referência BZL e NFX foram testados em dose-resposta contra *T. cruzi* infectando as diferentes linhagens celulares. De maneira geral, BZL apresentou uma baixa atividade nos ensaios, atingindo apenas 50% da inibição da infecção dentro

das concentrações testadas, com exceção da célula VERO (**figura 21A**). A atividade máxima detectada para BZL foi significativamente heterogênea nas células hospedeiras, variando de ~30% em THP-1 a ~75% em células VERO (**figura 21B**). Este perfil de atividade é esperado para a Y clH10, que é parcialmente resistente ao benznidazole (vide **parte III**).

O NFX exibiu um perfil de atividade mais consistente e eficaz no painel de linhagens celulares infectadas; além disso, valores de atividade máxima mais elevados para este composto foram observados, com ~96% de atividade máxima para VERO, ~78% para L6 e U2OS e ~60% para THP-1. Similarmente ao BZL, o menor valor de atividade máximo relatado também estava relacionado às células THP-1 (**figura 21B**).

Curiosamente, esses compostos nitroheterocíclicos parecem ser mais ativos quanto menores os valores de IR e número de parasitas/ células infectadas, exceto para a comparação entre os perfis de L6 e THP-1 (na qual a primeira apresentou maiores valores de IR e número total de células, mas foi mais susceptível do que a segunda linhagem). A atividade reduzida dos compostos nitroheterocíclicos na linhagem celular THP-1 pode estar associada ao estado metabólico celular e ao microambiente citoplasmático hostil de um fagócito profissional, cuja fisiologia celular afeta diretamente a invasão, a replicação e a progressão da infecção do parasita (32). Este estado celular particular também pode interferir com propriedades farmacodinâmicas dos compostos, reduzindo assim a eficácia antiparasitária. Ademais, respostas variáveis no tratamento com compostos referência já foram amplamente relatadas tanto entre diferentes cepas de *T. cruzi* como entre pacientes de doença de Chagas de localidades distintas, o que sugere que a variabilidade genética das populações de *T. cruzi* entre diferentes localidades pode estar correlacionada a diferença de eficácia do tratamento (78,206,217,237); adicionalmente, os dados apresentados aqui também sugerem que os diferentes tecidos infectados por *T. cruzi* (e as composições celulares típicas) também podem desempenhar um papel importante na variação da eficácia antiparasitária dos compostos a nível celular.

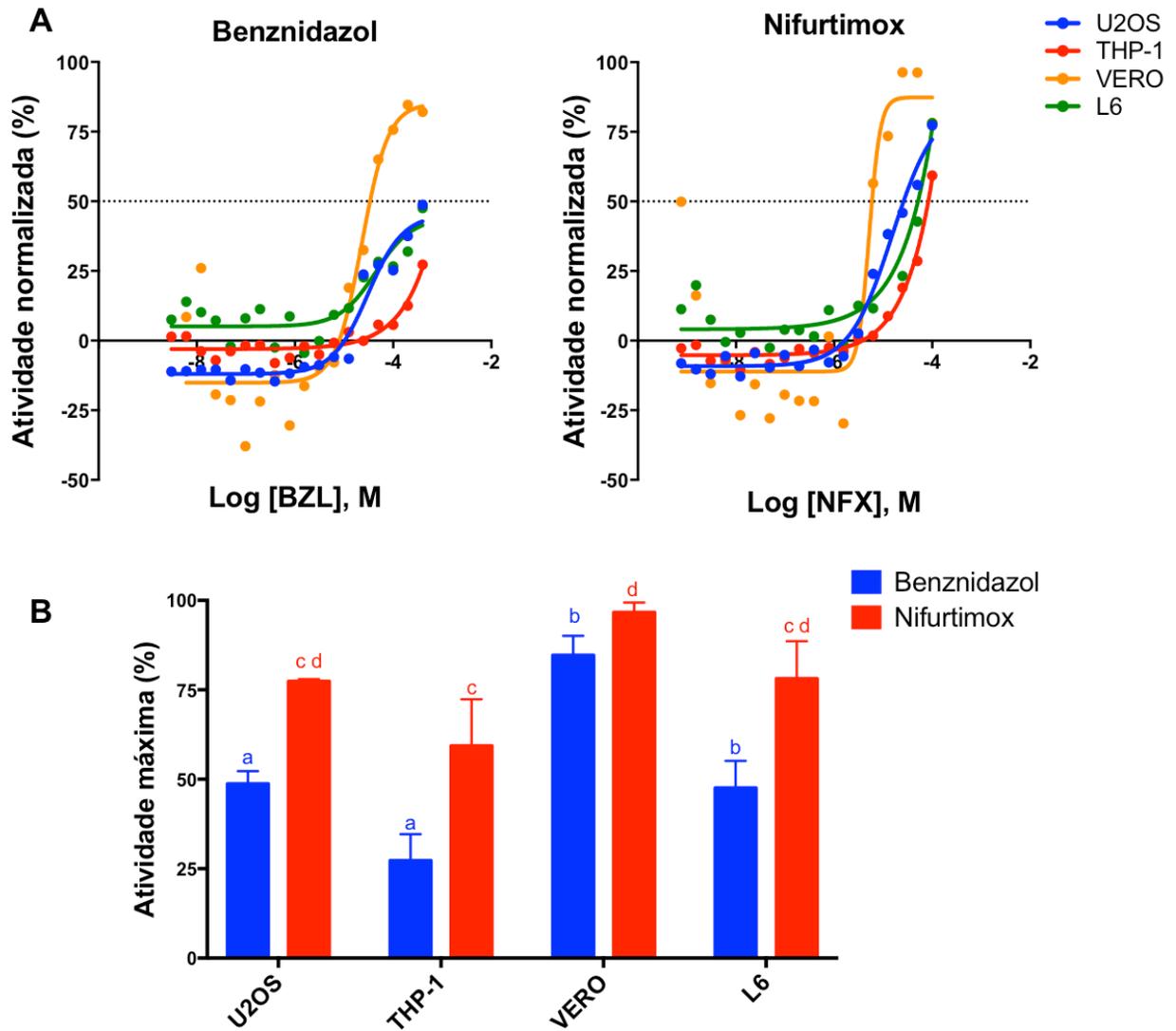


Figura 21. Perfil de atividade dos compostos referência benznidazol e nifurtimox contra diferentes linhagens de células hospedeiras infectadas com *T. cruzi*. **A.** Curvas dose-resposta para compostos de referência, eixo X: atividade normalizada dos compostos (em %); Eixo Y: Log da concentração do composto (em molar); as cores dos pontos e curvas indicam as células hospedeiras distintas. Os valores de R^2 (teste de adequação da curva) para as curvas de atividade de benznidazol e nifurtimox são respectivamente 0,8 e 0,9 para U2OS (azul), 0,5 e 0,8 para THP-1 (vermelho), 0,7 e 0,7 para VERO (amarelo) e 0,5 e 0,6 para L6 (verde). **B.** Eficácia de nifurtimox (vermelho) e benznidazol (azul) dado pelos seus valores máximos de atividade (eixo X) para células hospedeiras infectadas (eixo Y). Os dados representam a média de dois experimentos independentes - barras de erro indicam desvio padrão; letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os valores (dentro do tratamento com o mesmo composto) segundo teste ANOVA (*one-way*, $p < 0,001$).

4.4.2. Screening da biblioteca LOPAC contra diferentes células hospedeiras infectadas com *T. cruzi*

Uma biblioteca comercial contendo 1.280 compostos ativos farmacêuticos foi testada contra a cepa Y de *T. cruzi* infectando as linhagens celulares distintas. Todas as microplacas testadas foram consideradas aprovadas de acordo com os critérios de controle de qualidade (discutidos em 4.5.1). A **figura 22A** mostra o esquema de triagem da biblioteca; todos os 1.280 compostos foram testados contra os diferentes sistemas de linhagens celulares infectadas em uma concentração única de 10 μ M e o primeiro critério de seleção foi definido para filtrar compostos que apresentaram atividade normalizada \geq 50% e taxa de célula \geq 0,5. Este primeiro filtro de priorização selecionou um número diferente de compostos para cada linhagem celular: 55 compostos para U2OS, 16 compostos para THP-1, 28 compostos para VERO e 27 compostos para L6. Desconsiderando as repetições, 82 compostos foram selecionados a partir desta triagem primária; entre eles, apenas dois (2,4%) se encaixam nos critérios de seleção para todas as linhagens celulares testadas em conjunto, enquanto nove (11%) e 20 (24,4%) foram compostos comuns na seleção de três e duas linhagens celulares infectadas, respectivamente.

Surpreendentemente, 51 compostos (62,2%) foram selecionados exclusivamente a partir de uma linhagem celular infectada (**figura 22B** - gráfico de pizza esquerdo -). Ao investigar as linhagens infectadas com maior taxa de compostos exclusivos, as células U2OS infectadas exibiram a maior porcentagem com 27 compostos selecionados (53%), seguido de VERO com 13 compostos (25%); THP-1 e L6 apresentaram a proporção mais baixa, com 6 (12%) e 5 (10%) compostos, respectivamente (**figuras 22B** - gráfico pizza direito - e **22C**). O sistema de células THP-1 infectado produziu o menor número de compostos selecionados, provavelmente devido às limitações da linhagem celular discutidas em 4.5.1.. Embora amplamente utilizada como um modelo de células de macrófagos humanos, esta é, provavelmente, a primeira tentativa de usar as células THP-1 para triagem de compostos anti-*T. cruzi*; o processo de diferenciação artificial e outras particularidades do protocolo THP-1 podem interferir com os desempenhos dos compostos da biblioteca no ensaio antiparasitário.

Enquanto VERO e L6 apresentaram números intermediários de compostos selecionados, U2OS exibiu uma grande quantidade de compostos. Além disso, U2OS não apresentou apenas um número superior de compostos selecionados, mas também o maior número de compostos ativos foi listado para esta linhagem celular (**figura 22**).

Neste contexto, o número reduzido de compostos selecionados que eram comuns a todas as linhagens celulares (2,4% dos compostos selecionados) e o elevado número de compostos exclusivos a uma única célula hospedeira (62,2% dos compostos selecionados - **figura 22B**) sugerem que os resultados do *screening* primário gerados a partir de linhagens de células infectadas distintas podem ser extremamente dependentes da célula hospedeira empregada e sua interação específica com o parasita, e demonstram a relevância de considerar a inclusão de ensaios secundários com um painel de células hospedeiras como uma etapa adicional da cascata de triagem para descoberta de fármacos para doença de Chagas.

Dos 82 compostos selecionados, as células U2OS e L6 foram as linhagens infectadas que compartilhavam mais compostos em comum: 19, enquanto 12 compostos foram compartilhados entre linhagens celulares U2OS e VERO e apenas 10 compostos entre linhagens celulares L6 e VERO; as outras combinações duplas, triplas ou quádruplas renderam menos de 10 compostos compartilhados entre as linhagens celulares (**figura 22C**).

A susceptibilidade geral das células hospedeiras aos compostos selecionados pareceu estar associada a uma condição vulnerável causada previamente por maior infecção parasitária/replicação intracelular do parasita (ou seja, quanto maior a IR nos poços-controle, maior a citotoxicidade causada pelos compostos testados) (**tabela 12 e figura 23**); novamente, esta observação não se aplica à linhagem THP-1, provavelmente porque essa linhagem de células tipo macrófagos é naturalmente mais resiliente à ação de compostos, uma vez totalmente diferenciada (238).

Para continuidade em ensaios confirmatórios em dose-resposta os compostos foram considerados *hits* se preenchessem os critérios de seleção de 50% de atividade normalizada e 0,5 de taxa de célula em pelo menos três linhagens de células hospedeiras infectadas (**figura 22A**); portanto, 11 compostos foram prospectados de acordo com este

perfil e os ensaios confirmatórios foram realizados para melhor avaliar melhor os perfis de atividade (**figura 22A** e **figura 23**).

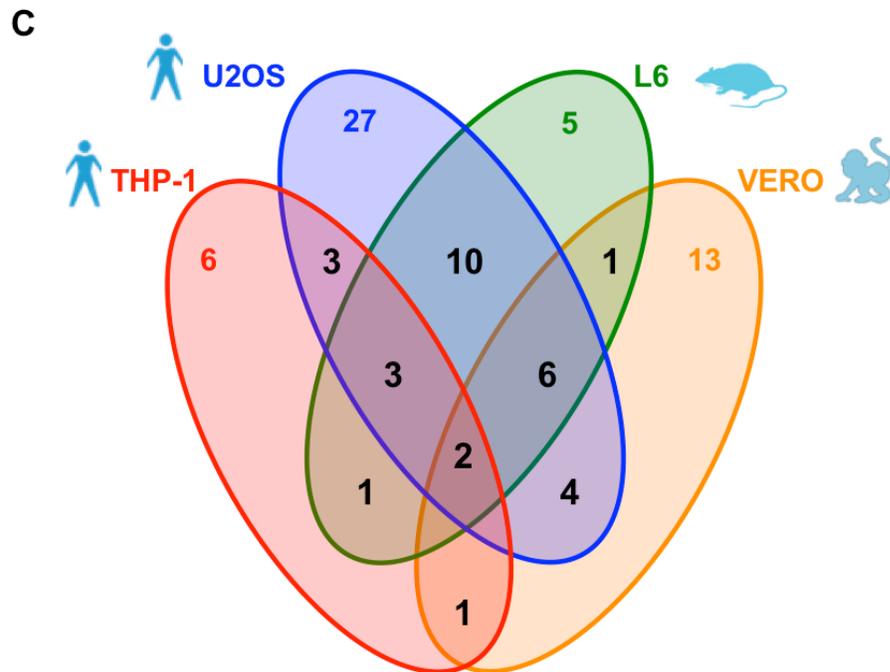
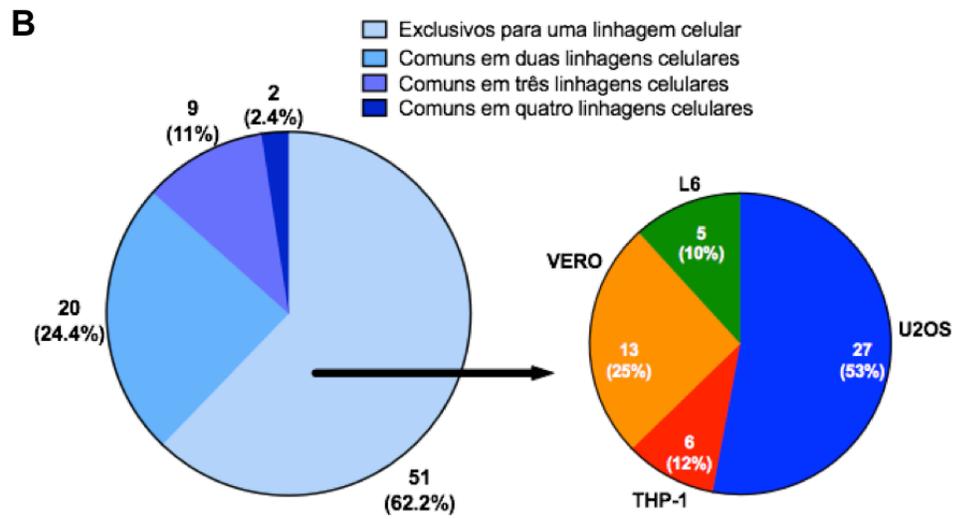
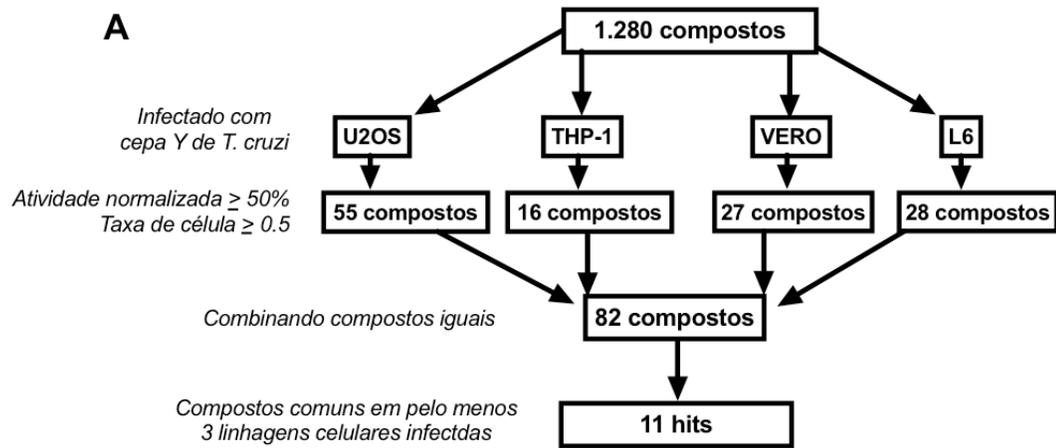


Figura 22. (Página anterior) Esquema de seleção e distribuição de compostos oriundos da triagem da biblioteca LOPAC nas diferentes linhagens celulares infectadas. A. Todos os 1.280 compostos foram selecionados contra cada linhagem celular infectada com a cepa Y de *T. cruzi*: U2OS, THP-1, VERO e L6; diferentes quantidades de compostos escolhidos para cada célula hospedeira, utilizando os critérios de seleção: atividade normalizada superior a 50% e taxa de célula superior a 0,5. Excluindo compostos repetidos, a lista de hits inclui 82 compostos potenciais e apenas 11 amostras foram compartilhadas entre pelo menos três linhagens celulares (*hits*). **B.** Gráfico esquerdo: porcentagem dos compostos selecionados, distribuídos por uma (exclusiva), duas, três ou quatro linhagens celulares infectadas. Gráfico direito: dissecando a distribuição de compostos exclusivos em relação às linhagens celulares específicas. **C.** O diagrama mostra distribuição e compartilhamento de compostos potenciais entre as células infectadas: números coloridos indicam o número exclusivo de compostos ativos para cada linhagem celular, enquanto os números nas regiões de interseção mostram compostos selecionados e compartilhados nas respectivas linhagens celulares. U2OS (azul), THP-1 (vermelho), VERO (laranja) e L6 (verde).

Uma lista contendo os 82 compostos selecionados é exibida na **figura 24** em ordem decrescente de atividade contra todas as linhagens celulares infectadas. Conforme já discutido acima, o sistema de células U2OS infectadas apresentou 21 compostos que exibiram atividade normalizada (AN) > 80%, enquanto células THP-1 infectadas exibiram apenas dois compostos com o mesmo perfil de atividade. As linhagens de células VERO e L6 exibiram, respectivamente, 13 e oito compostos cujas ANs foram superiores a 80% (**figura 23**). Esses dados reforçam a hipótese de que o sistema de célula U2OS infectadas é mais propenso a selecionar compostos com maior atividade ao passo que o sistema da THP-1 seleciona compostos com um perfil de atividade menos eficaz, como já observado nos testes com compostos referência (**figura 21**).

Composto	Atividade normalizada (%)				Taxa de célula				Classe
	U2OS	THP-1	VERO	L6	U2OS	THP-1	VERO	L6	
FPL 64176									
Sertaconazole nitrate									
AC-93253 iodide									
Clemastine fumarate salt									
CB1954 (Tretazicar)									
NNC 55-0396 (UNII-0A7CE46ERM)									
Indatraline hydrochloride									
ML324									
Ciotrimazole									
AEG 3482 (63735-71-7)									
Loperamide hydrochloride									
Ketoconazole									
Entecavir									
Pentamidine isethionate									
A-315456									
Tyrphostin AG 1478									
Nitidine chloride									
Mibefradil dihydrochloride									
PAC-1									
Paroxetine HCl hemihydrate									
Perifosine									
Moxonidine hydrochloride									
(S)-(+)- Camptothecin									
Haloperidol									
Ammonium pyrrolidinedithiocarbamate									
EU-0100695									
CP-31398 dihydrochloride hydrate									
Disulfiram (Tetraethylthiuram disulfide)									
M-110									
Caffeic acid phenethyl ester									
Carbachol									
LDN-214117									
Zimelidine dihydrochloride									
Terfenadine									
AZ191									
GSK1838705A									
PD153035 hydrochloride									
5-(N-Ethyl-N- isopropyl) amiloride (EIPA)									
T0070907 (131516-66-4)									
Ebastine									
Allopurinol									
Darifenacin hydrobromide									
SB 269970 hydrochloride									
MDL 28170									
WWL113									
Fluphenazine dihydrochloride									
JW74									
PD 169316									
Chlorpromazine hydrochloride									
U-101958 maleate									
Maprotiline Hydrochloride									
L-741,626									
5-(N,N- hexamethylene) amiloride									
CYM50358									
P-F-HHSID hydrochloride									
(±)-Metoprolol (+)-tartrate (56392-17-7)									
1-Phenyl-3-(2- thiazolyl)-2- thiourea									
Benazoline oxalate									
N-methylhistaprodifen dioxalate salt									
S-(+)-Fluoxetine hydrochloride									
Metrazoline oxalate									
Tacrine Hydrochloride (A3773)									
Phenamit methanesulfonate									
ML277									
Phenytoin									
Quinacrine dihydrochloride									
Cephalosporin C zinc salt									
2-Chloroadenosine									
Fluoxetine hydrochloride									
RepSox									
Niclosamide									
(B-168) (±)-Butaclamol hydrochloride									
BMS-189453									
Artemether									
(D-033) (+)-Butaclamol hydrochloride									
Fluvoxamine maleate									
Methocramine									
GR 127935 hydrochloride hydrate									
Sulcephalosporin									
Neboglamine									
Carvedilol									
Olvanil									

Legenda:

- Atividade < 50% / taxa de célula < 0,5
- Atividade 50 - 80% / taxa de célula 0,5 – 0,8
- Atividade > 80% / taxa de célula > 0,8
- Hits comuns em 3 linhagens de células
- Hits comuns em 4 linhagens de células

- Adrenoreceptor**
- Antibiótico**
- Anticonvulsivo**
- Apoptose**
- Bioquímico**
- Canal de Ca⁺**
- Ciclo Celular**
- Sinalização Celular**
- Stress Celular**
- Colinérgico**
- DNA**
- Dopamina**
- Regulação Gênica**
- Glutamato**
- Heat Shock Proteins**
- Histamina**
- Hormônio**
- Imidazol**
- imidazolina**
- Imunomodulador**
- Canal de íons**
- Bomba de íons**
- Canal de K⁺**
- Kinase/Fosfatase**
- Lipídeos**
- Canal de Na⁺**
- Neurobiologia**
- Neurotransmissão**
- Oxido nítrico**
- Opióide**
- Receptor P2**
- Fosforilação**
- Serotonina**
- Transcrição**
- Tirosina Kinase**

Figura 23. (Página anterior) Seleção de compostos da biblioteca LOPAC contra linhagens celulares distintas infectadas com *T. cruzi*: perfis dos candidatos a hits. Atividade normalizada (colunas à esquerda) e taxa de células (colunas à direita) associados aos compostos selecionados no screening primário, testados a 10 µM; cores destacadas indicam a faixa dos valores de atividade / taxa de célula: <50% / 0,5 (vermelho), 50 - 80% / 0.5 - 0.8 (amarelo) e > 80 / 0.8 (verde). Cor cinza na lista de compostos (dispostos por ordem decrescente de atividade) revela aqueles selecionados em três linhagens celulares, enquanto o azul claro destaca hits comuns nas quatro linhagens celulares. A última coluna à direita indica a classificação dos compostos selecionados (de acordo com o perfil disponível nas informações da biblioteca) representada pelo código de cores indicado na caixa da legenda.

As classes de compostos selecionados foram distribuídas em 35 categorias de acordo com a classificação do fornecedor (padrão de cores, **figura 23**), e o grupo de compostos associados a neurotransmissão e sistema nervoso central (CNS) apresentaram maior porcentagem entre os compostos selecionados: dopaminérgicos, serotoninérgicos e adrenorreceptores ocuparam respectivamente 11%, 8,5% e 6,1% das 82 classes de compostos selecionados; também representando 6,1% dos compostos selecionados, a classe dos histamínicos, colinérgicos e indutores de apoptose destacaram-se entre as demais classes de compostos (estas outras representadas por menos de 4% dos selecionados) (**figura 23**). No entanto, quando a frequência da classe farmacológica na lista de compostos selecionados é comparada à da composição da biblioteca toda (enriquecimento de uma classe), é notável que nem os adrenoreceptores e nem os colinérgicos foram enriquecidos nos resultados de triagem, já que a frequência dessas classes é proporcional no arranjo dos compostos da biblioteca (**figura 24B**). Além disso, a neurotransmissão e as classes do SNC já foram relatadas como classes promíscuas na geração de *hits off-target*, isto é, apresentam baixa especificidade (123,239). Por outro lado, os *hits* selecionados (aqueles compostos ativos/seletivos contra, pelo menos, três linhagens celulares) apresentaram um aumento significativo na frequência quando comparado à composição da biblioteca, especialmente no caso dos azólicos e dos ligados a proteínas *heat shock*, que apresentaram >100 vezes o enriquecimento (**figura 24C**). O maior enriquecimento da biblioteca foi notado para classe dos azólicos, como esperado, já que é uma classe de compostos com elevado potencial de atividade para cepa Y de *T. cruzi*; mas o enriquecimento também ocorreu para as classes associadas a proteínas imunomoduladoras e *heat shock*, sob graus similares (**figura 24C**). Outras classes de compostos apresentaram enriquecimento moderado (>10 vezes), entre estas estão as classes das imidazolininas, tirosina quinase,

sinalização celular, indução de apoptose, associadas ao ciclo celular, histamínicas e interferentes dos canais de Ca^{+2} (**figura 24C**); estas classes de compostos já foram associadas com atividade anti-*T. cruzi* em outros estudos (123,240–244).

Aparentemente, a distribuição das classes farmacológicas dos compostos selecionados segue um perfil típico de triagem de biblioteca de diversidade contra *T. cruzi*, as classes de compostos mais ativos contra a maioria dos sistemas de células infectadas são predominantemente conhecidas. Nota-se que, quando a seleção dos compostos é reduzida para aqueles ativos contra, ao menos, três linhagens celulares infectadas (seleção de *hits*), um aumento significativo de enriquecimento é previsível para os compostos azólicos e para aqueles com mecanismos de ação associados ao DNA, classes amplamente exploradas na quimioterapia antichagásica. Porém, o enriquecimento de seleção de hits também envolveu compostos relacionados com proteínas *heat shock*, canal de Ca^{2+} e associados à sinalização celular (**figura 24C**), indicando que essas classes devem ser consideradas dentro de uma abordagem multi-celular.

Apesar de não termos observado uma correlação geral entre similaridade químico-estrutural dos compostos selecionados com seus perfis de atividade, uma análise de aglomeração hierárquica em *cluster*, realizada com base em estruturas de compostos selecionadas, destacou quatro compostos estruturalmente semelhantes que eram comumente ativos contra três linhagens celulares infectadas: entecavir, cloridrato de moxonidina, CB1954 e AEG 3482 (**figura 24A**). Além dessa correlação, não foi possível estabelecer outras associações diretas com os resultados da classificação hierárquica com e os demais dados de atividade ou citotoxicidade dos compostos restantes.

4.4.3. Confirmação de compostos *hits* contra diferentes cepas de *T. cruzi*

Considerando as diferenças evidentes observadas entre a atividade de compostos dentro das linhagens celulares testadas, é possível considerar que a variabilidade observada neste modelo *in vitro* seja biologicamente relevante no curso da doença, uma vez que o parasita invade diversos tipos de células hospedeiras diferentes no mamífero e a atividade dos compostos pode ser desigual dentro dos diferentes tecidos; conseqüentemente, sugerimos que um composto *hit* seja ativo na maioria das linhagens celulares infectadas testadas (neste caso, pelo menos três linhagens celulares). Usando este critério, 11 hits foram finalmente selecionados para ensaios secundários, nos quais foram testados de forma dose-resposta contra Y clH10, CL Brener e Sylvio X10/1.

Os 11 compostos foram testados em dez pontos de concentração contra as três cepas de *T. cruzi* infectando a linhagem de células U2OS (**tabela 13**). Os compostos de referência BZL e NFX também foram usados, e os resultados foram compatíveis com os descritos anteriormente (**4.5.1**). Todos os compostos testados apresentaram índices de seletividade elevados (sendo que a menor seletividade > 65). Além dos compostos de referência e dos fármacos azóis, já bem estudados, destacamos as moléculas que sobressaíram com geração de $EC_{50} < 10 \mu\text{M}$ contra, pelo menos, duas cepas de *T. cruzi* e com atividade máxima maior que 80%: CB1954, AEG3482, FPL 64176 e clemastina.

Alguns dos compostos selecionados testados foram menos potentes contra CL Brener, o antifúngico clotrimazol foi aproximadamente 200 vezes menos potente para essa cepa, se comparado aos valores EC_{50} encontrados para YclH10 e Sylvio X10/1. Outros compostos azólicos, como sertocanazol e cetoconazol, também foram pelo menos 40 vezes menos potentes contra a cepa CL Brener. Esses resultados corroboram nossos estudos, inclusive aqui discutidos, que concluíram que as cepas de *T. cruzi* apresentam resposta variável aos compostos de azóis, *in vitro* (206).

Figura 24. (Página anterior) Agrupamento hierárquico em *clusters* e distribuição de frequência de compostos e frequência dos compostos selecionados. **A.** Um dendograma de ligação única foi construído por meio de *clusters* de aglomeração hierárquica baseada hierárquicos com base em semelhanças de compostos em pares, definidas usando os descritores *Atom Pair* e coeficiente de Tanimoto (<http://chemminetools.ucr.edu>). Os destaques cinza nas listas de compostos mostram compostos selecionados em 3 linhagens celulares, enquanto o azul claro destaca ataques comuns nas quatro linhagens celulares. **B.** Comparação de perfil de distribuição entre a frequência (em porcentagem, eixo Y) de classe dos compostos (eixo X) dos 82 hits selecionados (colunas pretas) e a frequência em toda a biblioteca de compostos (colunas cinzas). **C.** Classe farmacêutica dos 11 hits selecionados que foram ativos contra, pelo menos três linhagens celulares, sua frequência neste conjunto selecionado e a respectiva taxa de enriquecimento que indicando o aumento na frequência em relação a toda a composição da biblioteca.

Discrepância semelhante também foi observada para os compostos não-azólicos, tais como a tirfostina AG1478 e o entecavir, que não geraram valores de EC_{50} contra a cepa CL Brener, apresentando, portanto, uma eficácia contida. Por outro lado, CL Brener foi excepcionalmente mais suscetível (em termos de potência), quando comparado a Sylvio X10/1 ou Y clH10, aos compostos BZL, CB1954, mibefradil e clemastina (**tabela 13, figura 25**). A maior susceptibilidade das cepas pode estar relacionada ao fato de esses compostos atuarem em mecanismos de ação mais amplos ou inibirem alvos altamente conservados dentro das cepas de *T. cruzi*. Por exemplo, o CB1954 que apresentou a maior potência contra as cepas, é um composto nitroheterocíclico com atividade anti-tripanosomatídeo relatada (245); mibefradil é um bloqueador não-dihidropiridínico de canais de Ca^{2+} com atividade conhecida contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (246); e a clemastina é um composto anti-histamínico com atividade contra *T. cruzi* em monoterapia e combinado com fármacos referência (122). Não foram encontrados relatos de atividade anti-*T. cruzi* pra os compostos AEG3482 e FPL 64176, que também apresentaram eficácia e potência satisfatórias em amplo espectro de ação contra as cepas testadas; enquanto o primeiro parece induzir a expressão da proteína *heat shock* 70 e inibir a apoptose celular (247), o segundo é um composto benzoil-pirrol que atua como um forte ativador de Ca^{2+} (248).

O mecanismo de ação anti-apoptótico de AEG3482 deve ser melhor investigado em relação a inibição da infecção por *T. cruzi*, alternativamente, o composto também pode atuar contra outro alvo não descrito no parasita ou na célula hospedeira. Sabendo que o desequilíbrio da homeostase de Ca^{2+} já foi demonstrada como uma abordagem importante na eliminação de *T. cruzi* (249), com vários compostos descritos com potente

atividade anti-*T. cruzi*, como a amiodarona, o posaconazol (250) e mibefradil (246); FPL 64176 foi descrito aqui, pela primeira vez, como um agente anti-*T. cruzi* com atividade de amplo espectro contra diferentes linhagens de células infectadas e cepas distintas do parasita, sem consequências prejudiciais significativas para as células hospedeiras. Os *hits* selecionados também foram testados contra a célula L6 infectada com parasitas da cepa Y de *T. cruzi*, no mesmo esquema de dose-resposta; os valores associados a potência, eficácia e seletividade foram conservados nessa linhagem celular (dados não mostrados), com exceção do composto mibefradil que não apresentou valor de EC₅₀ nesta linhagem celular (inclusive com valor de atividade máxima < 40%). A atividade deste composto e sua citotoxicidade contra essa linhagem celular já haviam sido moderada e baixas, respectivamente, no *screening* primário.

A triagem da biblioteca LOPAC com *T. cruzi* infectando diversas linhagens celulares mostrou que, ao menos no *screening* primário, existe um baixo índice de seleção de compostos em comum para as diferentes células hospedeiras infectadas, na qual apenas dois compostos selecionados foram comuns em todas as quatro linhagens celulares (clemastina e FPL 64176); notou-se também que dos compostos selecionados, 51 foram exclusivos de uma única linhagem de célula. Os ensaios confirmatórios em dose-resposta foram realizados contra três cepas de *T. cruzi* (Y clH10, CL Brener e Sylvio X10/1) e os compostos CB1954, FPL64176, AEG3482 e entecavir destacaram-se entre os hits, apresentando valores de EC₅₀ inferiores a 10 µM e CC₅₀ superiores a 100 µM em pelo menos duas cepas de *T. cruzi*.

Tabela 14. Confirmação dos compostos hits da LOPAC: compostos testados em dose-resposta (10 pontos de diluição) contra células U2OS infectadas com cepa Y de *T. cruzi*. Os valores representam os resultados EC₅₀ (em µM) - quando gerados - e atividade máxima (em %).

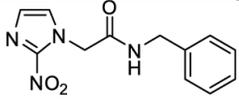
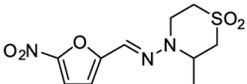
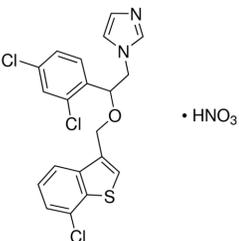
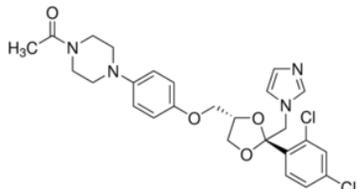
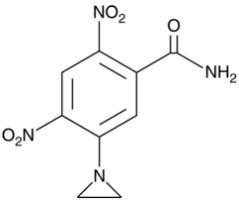
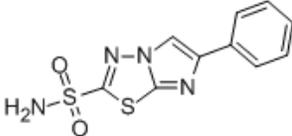
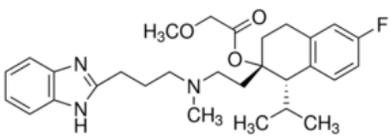
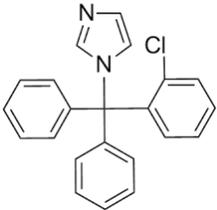
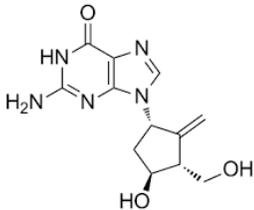
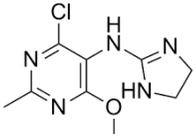
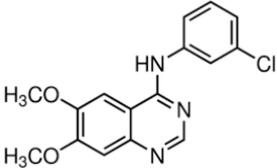
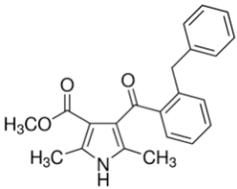
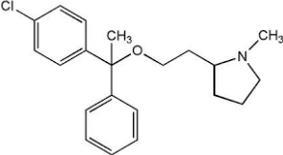
Composto	Estrutura química	Y clH10		CL Brener		Sylvio X10/1	
		EC ₅₀ (µM)	MA (%)	EC ₅₀ (µM)	MA (%)	EC ₅₀ (µM)	MA (%)
Benznidazol		2,2	97	8,9	103	0,9	110
Nifurtimox		0,9	102	4,9	97	0,3	98
Sertoconazol		1,4	101	>100	46	3,1	87
Cetoconazol		<0,2	99	8,4	61	<0,2	94
CB1954		<0,4	102	<0,4	73	<0,4	92
AEG3482		1,1	102	3,9	86	0,5	97
Mibefradil		9,3	111	8,2	106	12,2	63

Tabela 13. Continuação

Composto	Estrutura química	Y cIH10		CL Brener		Sylvio X10/1	
		EC ₅₀ (μ M)	MA (%)	EC ₅₀ (μ M)	MA (%)	EC ₅₀ (μ M)	MA (%)
Clotrimazol		<0,2	97	69.6	76	0,5	82
Entecavir		3,2	80	>100	15	0,7	87
Cloridrato de moxonidina		10,1	109	14	88	7,4	81
Tirfostina AG1478		5,7	79	>100	29	6,6	79
FPL 64176		2,2	97	12,5	79	4,3	84
Clemastina		0,9	111	7,6	87	17,6	83

* quando o valor não é gerado: EC₅₀ < mínimo ou EC₅₀ > concentração máxima testada. Resultados derivados de um único experimento. Fontes das estruturas químicas: (<https://sigmaaldrich.com>) e (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>).

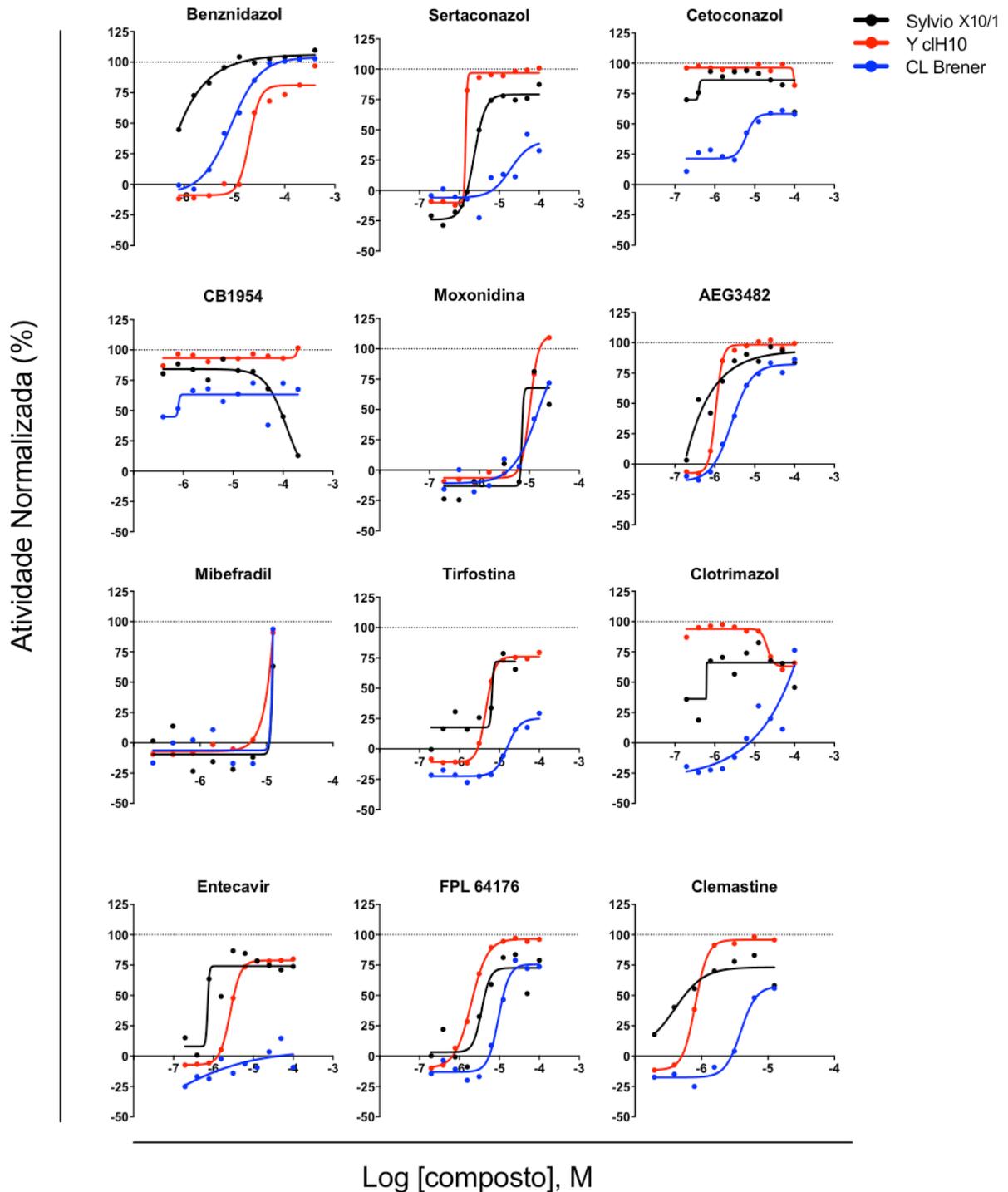


Figura 25. Ensaios de confirmação de compostos hits: teste em dose-resposta contra cepas de *T. cruzi* Y, CL Brener e Sylvio X10/1. Eixo X: atividade normalizada dos compostos (em %); Eixo Y: Log da concentração do composto (em molar); pontos e curvas coloridos indicam diferentes cepas de *T. cruzi*: Y (vermelho), CL Brener (azul) e Sylvio X10 / 1 (preto). A linhagem celular U2OS foi utilizada como célula hospedeira para a realização desses ensaios.

4.4.4. Combinação dos compostos *hits* da LOPAC com fármacos referência

Uma tendência na descoberta de fármacos contra doença de Chagas é a abordagem da terapia combinatória usando medicamentos de referência e / ou novos compostos ativos, a fim de aumentar a eficácia da terapia, diminuir os efeitos colaterais com redução das doses terapêuticas e evitar a emergência da resistência (173,251).

Para os testes combinatórios, foi decidido pela seleção dos compostos mais potentes ($EC_{50} < 10 \mu\text{M}$) e que apresentaram atividade máxima superior a 80% contra, pelo menos, duas cepas de *T. cruzi*, foram eles: CB1954, AEG3482, entecavir e FPL 64176. Apesar de se adequarem nos critérios, os compostos clemastina e os azóis não foram selecionados, pois já foram amplamente estudados contra *T. cruzi*. Os compostos foram comprados do fabricante e re-testados para confirmação de atividade antes do início dos testes em combinação; curiosamente, o AEG3482 apresentou um valor de EC_{50} elevado ($EC_{50} > 80 \mu\text{M}$) e baixa seletividade ($SI < 1$) neste teste preliminar, com citotoxicidade bastante elevada em comparação com o observado no *screening* primário e, portanto, não foi considerado para os testes em combinação.

Após aquisição dos resultados das análises de alto conteúdo, os dados foram processados e foram determinados os valores de FIC (*fractional inhibition concentration*) para cada combinação realizada. As interações do BZL com entecavir e com FPL 64176 apresentaram médias de ΣFIC em torno de 1,8 e 1,1, respectivamente, o que caracteriza uma interação aditiva/indiferente (**tabela 14**); é possível notar também, através do isoblograma, que os pontos médios da interação entecavir-BZL estão bem acima da linha da aditividade, enquanto os pontos plotados da interação FPL-BZL tangenciam esta linha (**figura 26A e 26C**). Já o entecavir e o FPL 64176 associados com o posaconazol geraram médias de ΣFIC de 1,8 e 1,5, respectivamente, e também foram caracterizadas como aditivas ou indiferentes (**tabela 15 e figura 26B e 26C**).

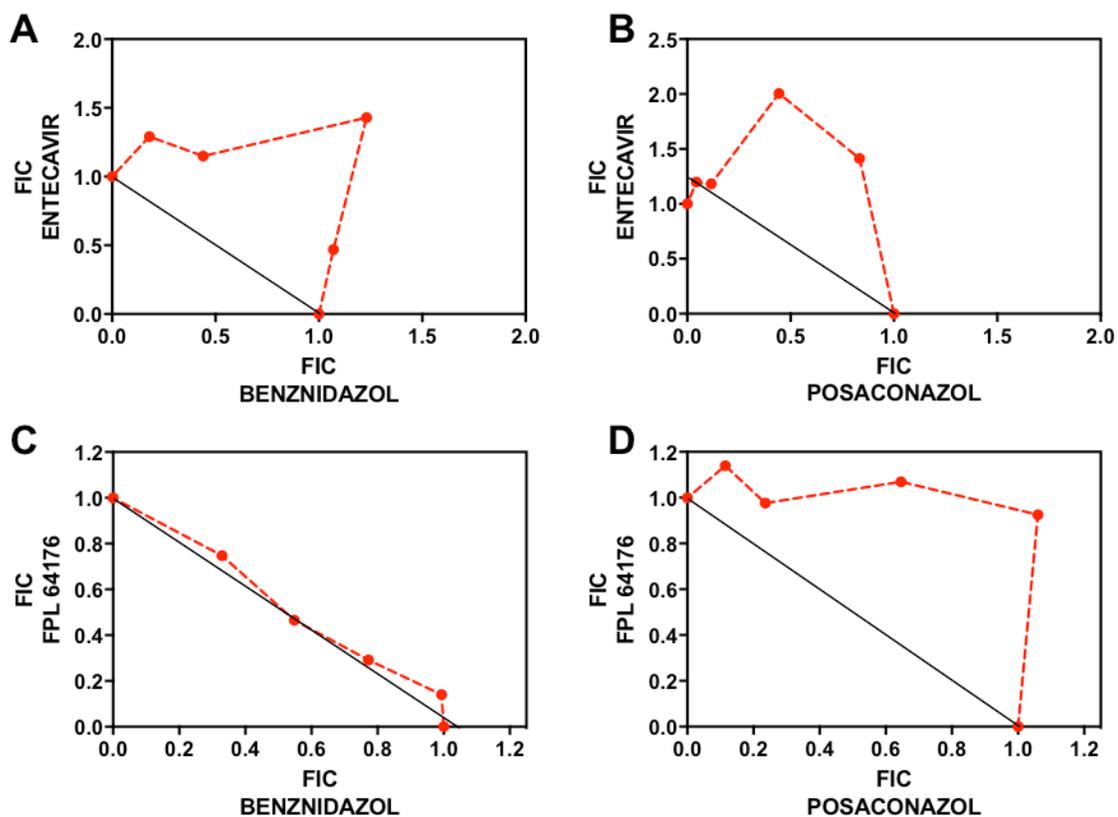


Figura 26. Isobogramas de combinação entre hits da biblioteca LOPAC com os compostos referência. A. Combinação entre entecavir e benznidazol; **B.** Combinação entre entecavir e posaconazol; **C.** Combinação entre FPL 64176 e benznidazol; **D.** Combinação entre FPL 64176 e posaconazol. Gráficos traçados a partir da média entre dois experimentos independentes.

Apesar de nenhuma interação entre os compostos ter sido classificada como sinérgica (média de $\Sigma FIC \leq 0,5$), ao menos não apresentaram perfis de antagonismo (média de $\Sigma FIC > 4$) sob as razões de concentrações testadas.

Os testes de combinação realizados com o composto CB1954 falharam devido a baixa densidade celular e taxa de infecção reduzida no experimento (dados não mostrados). O teste será repetido futuramente.

Tabela 15. Perfil de combinação do composto referência benznidazol (BZL) com os compostos selecionados da biblioteca LOPAC FPL 64176 (FPL) e entecavir (ENT), destacando os valores de FIC e o modelo de interação entre as moléculas.

Composto	Proporção EC ₅₀ BZL: EC ₅₀ <i>hit</i>	EC ₅₀ BZL (μ M)	EC ₅₀ <i>hit</i> (μ M)	FIC BZL	FIC <i>hit</i>	Σ FIC	Modo de interação
FPL	5:0	16,2 \pm 2,9	0	1	0		Aditivo ou indiferente
	4:1	16,2 \pm 8,5	0,4 \pm 0,2	0,99	0,14	1,13	
	3:2	12,6 \pm 7,6	0,8 \pm 0,4	0,77	0,29	1,06	
	2:3	8,9 \pm 0,4	1,3 \pm 0,7	0,54	0,46	1,01	
	1:4	5,4 \pm 1,8	2,2 \pm 0,7	0,32	0,74	1,08	
	0:5	0	2,9 \pm 1,0	0	1		
Entecavir	5:0	14,6 \pm 5,0	0	1	0		Aditivo ou indiferente
	4:1	15,7 \pm 2,7	0,7 \pm 0,1	1,07	0,47	1,55	
	3:2	17,9 \pm 3,3	2,0 \pm 0,4	1,23	1,43	2,66	
	2:3	6,4 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1	0,44	1,15	1,59	
	1:4	2,7 \pm 0,3	1,8 \pm 0,2	0,18	1,29	1,47	
	0:5	0	1,4 \pm 0,1	0	1		

Os dados de EC₅₀ representam a média \pm desvio padrão dos valores obtidos em dois experimentos independentes.

Tabela 16. Perfil de combinação do composto referência posaconazol (PSL) com os compostos selecionados da biblioteca LOPAC FPL 64176 (FPL) e entecavir (ENT), destacando os valores de FIC e o modelo de interação entre as moléculas.

Composto	Proporção EC ₅₀ PSL: EC ₅₀ <i>hit</i>	EC ₅₀ BZL (μ M)	EC ₅₀ <i>hit</i> (μ M)	FIC BZL	FIC <i>hit</i>	Σ FIC	Modo de interação
FPL	5:0	11,4 \pm 2,8	0	1	0		
	4:1	12,1 \pm 0,8	1,3 \pm 0,6	1,06	0,93	1,99	
	3:2	7,4 \pm 1,2	1,5 \pm 0,2	0,64	1,06	1,70	Aditivo ou indiferente
	2:3	2,7 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	0,24	0,88	1,12	
	1:4	1,3 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	0,11	1,14	1,25	
	0:5	0	1,4 \pm 0,1	0	1		
Entecavir	5:0	10,8 \pm 0,8	0	1	0		
	4:1	9,0 \pm 0,7	1,1 \pm 0,1	0,83	1,41	2,24	
	3:2	4,8 \pm 0,2	1,6 \pm 0,1	0,44	2,00	2,44	Aditivo ou indiferente
	2:3	1,3 \pm 0,5	0,9 \pm 0,4	0,12	1,18	1,30	
	1:4	0,5 \pm 0,02	1,0 \pm 0,04	0,04	1,20	1,24	
	0:5	0	0,8 \pm 0,1	0	1		

Os valores de EC₅₀ representam a média \pm desvio padrão dos dados obtidos em dois experimentos independentes.

4.5. Influência de diferentes cepas de *T. cruzi* em HCS: triagem da biblioteca *Pathogen Box*

4.5.1. Escolha das cepas e teste no modelo do ensaio de alto conteúdo

Considerando o volume limitado no estoque de compostos disponível na *Pathogen Box*, foram priorizadas três cepas de *T. cruzi* para serem submetidas à triagem primária desta biblioteca. As cepas escolhidas de grupos filogenéticos distintos (DTU) foram a Sylvio X10/1 (TcI), Y (TcII, aqui representada pelo clone Y cIH10, cujo processo de derivação e caracterização fenotípica está descrito na terceira parte desta tese) e CL Brener (TcVI). A seleção destas cepas baseou-se na importância epidemiológica desses grupos filogenéticos, predominantemente associados com o ciclo doméstico da doença de Chagas (252), além de possuírem um padrão de infectividade ideal para triagem de compostos (alto rendimento de tripomastigotas em cultura, elevada taxa de infecção baixa variabilidade entre ensaios).

Como controle de qualidade da triagem, as cepas foram submetidas a um teste de atividade com compostos referência (BZL e PSL). O perfil de atividade do composto BZL foi mais homogêneo para as cepas testadas, apesar da resistência parcial que pode ser observada para Y cIH10 ($EC_{50} = 22,7 \mu\text{M}$, $MA < 90\%$), o que já era de nosso conhecimento (ver **parte III**) já a potência e eficácia observadas para as cepas CL Brener e Sylvio X10/1 foram semelhantes ($EC_{50} = 3,9 \mu\text{M}$ / $MA = 107,6\%$ para CL Brener e $EC_{50} = 3 \mu\text{M}$ / $MA = 98,4\%$ para Sylvio X10/1). O PSL apresentou atividade variável contra as cepas, principalmente em termos de potência (com valores de EC_{50} variando de 0,7 a 2,9 nM), enquanto a eficácia foi mais consistente, atingindo 85%, 92% e 97% de atividade normalizada para Sylvio X10/1, CL Brener e Y cIH10, respectivamente (**Figura 27**).

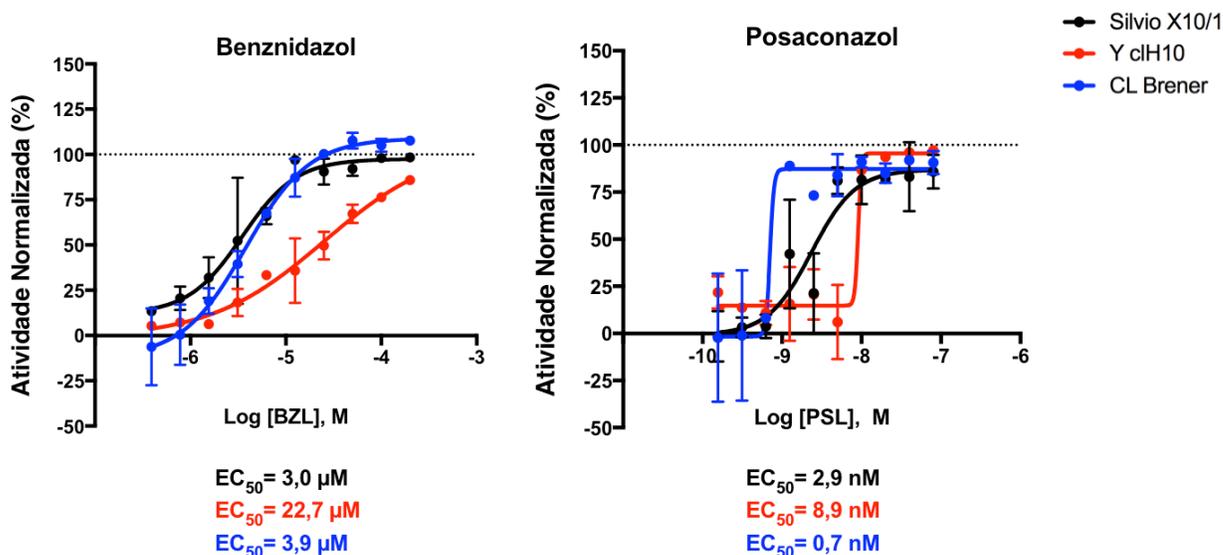


Figura 27. Perfil de atividade dedos compostos benznidazol e posaconazol sobre cepas utilizadas na triagem da biblioteca Pathogen Box. Eixo Y indica a atividade normalizada dos compostos BZL (esquerda) e PSL (direita) enquanto o eixo X marca o Log da concentração dos compostos (em molar). Curva dose-resposta da atividade dos compostos sobre as cepas estão indicadas pelas cores: Sylvio X10/1 (preto), Y clH10 (vermelho) e CL Brener cl1 (azul); as mesmas cores indicam os respectivos valores de EC₅₀ para os compostos em micromolar (BZL) e nanomolar (PSL).

4.5.2. Screening da biblioteca Pathogen Box contra diferentes cepas de *T. cruzi*

Toda as placas utilizadas na triagem da biblioteca foram consideradas aprovadas com valores médios do fator Z' de $0,8 \pm 0,01$ para Sylvio X10/1, $0,5 \pm 0,02$ para Y clH10e $0,6 \pm 0,02$ para CL Brener. Estes valores refletem o grau de variação (de cada cepa: em termos de perfil de infecção, replicação de amastigotas intracelular) e a separação gerada entre os controles negativo e positivo; na **figura 28** é possível visualizar a maior separação entre os controles no ensaio com Sylvio X10/1em comparação com as demais cepas. O grau elevado de separação dos controles, juntamente com a homogeneidade da infecção entre os poços formam elementos essenciais para geração de um fator Z' de alta qualidade. A maior separação dos controles se dá também, em parte, pela maior taxa de infecção observada para Sylvio X10/1 (IR de aprox. 80%) em relação àquelas constatadas para Y-H10 (IR de aprox.66%) e CL Brener (IR de aprox.48%); esses dados corroboram os resultados apresentados nos ensaios de validação das cepas de *T. cruzi* (**figura 18**), exceto para cepa Y cujo estoque utilizado nesta triagem foi outro (clH10).

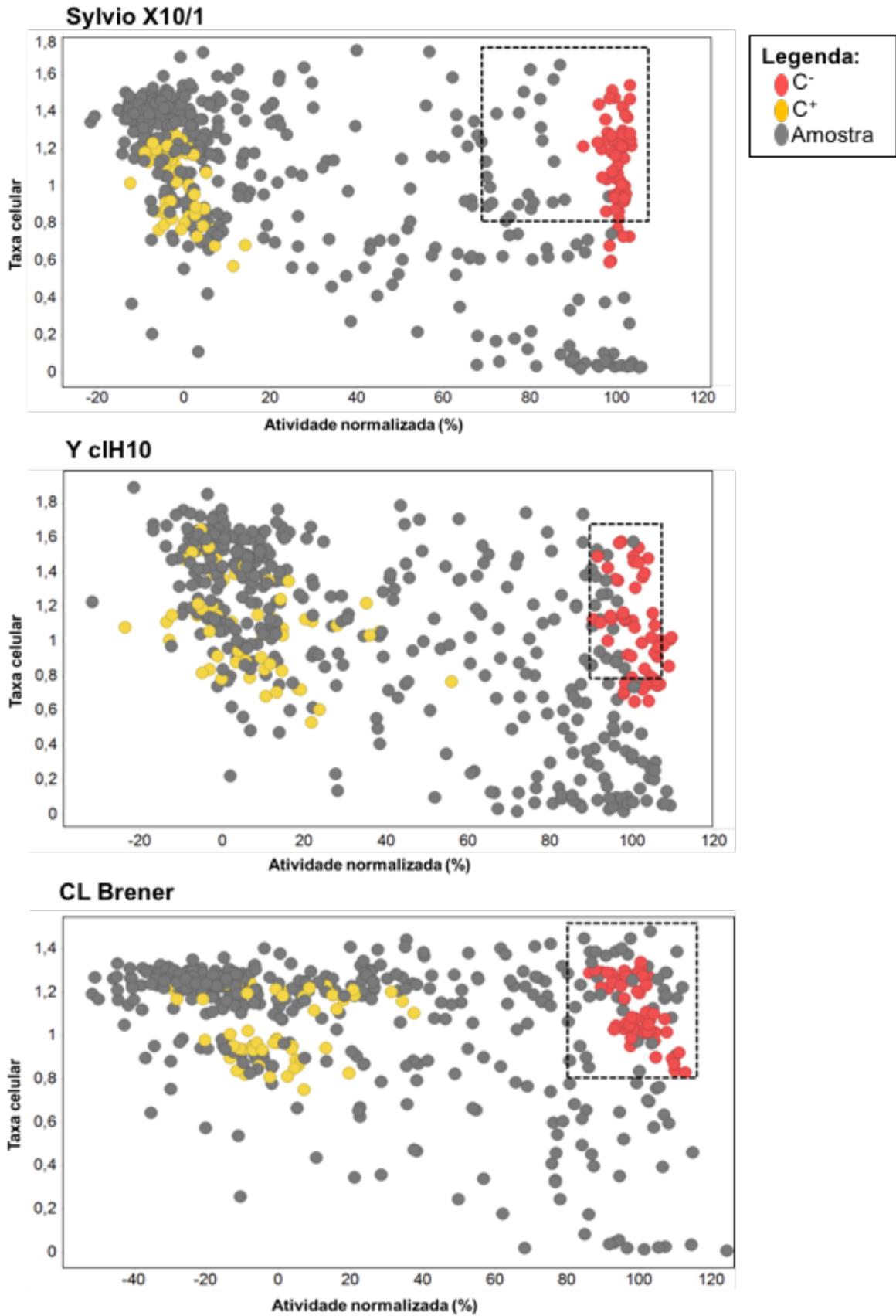


Figura 28. (Página anterior) Triagem da biblioteca Pathogen Box contra cepas de *T. cruzi*. Correlação entre taxa celular (eixo Y) e atividade normalizada (em %, eixo X). Pontos vermelhos representam poços do controle negativo (C-, DMSO 1%), pontos amarelos representam poços do controle positivo contendo células não infectadas (C+, NI), pontos cinzas indicam as amostras testadas da biblioteca. A delimitação retangular tracejada indica os *hits* selecionados com mínimo de 0,8 de taxa celular, sendo os 20 compostos com maior atividade normalizada para cada uma das cepas de *T. cruzi* testadas: Sylvio X10/1 (gráfico superior), Y clH10 (gráfico do meio) e CL Brener cl1 (gráfico inferior).

A quantidade de compostos ativos no *screening* primário foi relativamente grande (**figura 28**), provavelmente devido a uma concentração única de 20 μM utilizada, pois a mesma placa estoque foi preparada para a triagem contra *Leishmania* spp. (na qual usualmente as bibliotecas são testadas a 20 μM); os resultados obtidos no *screening* destes kinetoplastídeos serão comparados.

Com intuito de fazer uma análise comparativa entre as cepas, o critério utilizado para seleção dos compostos foi dos 20 mais ativos para cada cepa de *T. cruzi* com taxa de célula mínima de 0,8. O perfil geral da atividade dos compostos da biblioteca variou de acordo com a cepa testada; a seleção de *hits*, delimitada na **figura 28**, evidencia que a faixa de atividade dos compostos selecionados variou significativamente entre as cepas. A seleção dos *hits* para Sylvio X10/1 abrange compostos na faixa de 72% - 98% de atividade normalizada; já os *hits* de Y clH10 restringem-se na faixa de 89 – 100%, enquanto aqueles selecionados contra CL Brener variam apenas entre 97 – 110%. Este perfil de seleção revela nitidamente a maior susceptibilidade de algumas cepas (como a CL Brener) em relação a outras (como a Sylvio X10/1 e a Y clH10) e da importância em testar compostos anti-*T. cruzi* contra um painel de cepas.

4.5.3 Perfil dos compostos *hits* selecionados da biblioteca *Pathogen Box*

Partindo dos critérios de seleção (20 compostos mais ativos de cada cepa, com taxa de célula mínima de 0,8), 42 *hits* foram selecionados no total, já considerando aqueles comuns entre as cepas. CL Brener apresentou a maior quantidade de *hits* exclusivos (11), seguida da Y clH10 (9) e da Sylvio X10/1 (8); já as cepas Y clH10 e Sylvio X10/1 compartilharam um maior número de *hits* entre si (5). Apenas quatro compostos *hits* foram comuns entre as cepas testadas (**figura 29A**).

Curiosamente, dois compostos relacionados com filariose linfática (MMV687776) e tuberculose com (MMV687749) foram selecionados como *hits* comuns entre duas cepas (Sylvio X10/1 x CL Brener e Sylvio X10/1 x Y clH10, respectivamente); já os compostos nifurtimox e posaconazol (dois dos 26 compostos referência para diferentes patógenos da composição da biblioteca) só foram selecionados contra uma única cepa (Sylvio X10/1 e Y clH10, respectivamente) (**tabela 16**). Sabendo que a falha terapêutica e baixa eficácia do posaconazol pode ser explicada, em parte, por variações de susceptibilidade as diversas cepas de *T. cruzi*, este ensaio e seus resultados preliminares reforçam a importância de triar os compostos contra um painel de cepas a fim de priorizar aqueles com amplo espectro de atividade. Conforme esperado, as classes dos *hits* selecionados desta triagem que obtiveram maior enriquecimento de compostos (maior frequência entre os hits em relação a frequência na biblioteca), foram as dos kinetoplastídeos e dos compostos referência com aumentos de aproximadamente 3x e 2x de frequência dos hits em relação à da biblioteca (**figura 29B**). Porém, é interessante notar que quase 10% (10 de 116 no total) dos compostos associados a tuberculose disponíveis na biblioteca foram selecionados como *hits* anti-*T. cruzi*, o que reforça a ideia de um possível reposicionamento de compostos (**figura 29B e tabela 16**).

Outros compostos referência que foram selecionados contra apenas uma das cepas testadas foram a clemastina, a miltefosina e a buparvaquona. Selecionados apenas contra a cepa CL Brener de *T. cruzi*, a clemastina é um anti-histamínico com atividade anti-*T. cruzi* já descrita (122) que também foi selecionado por nós na triagem da biblioteca LOPAC (**seção 4.4.**); já a miltefosina é um composto referência no tratamento de leishmanioses e com atividade antichagásica reportada (253,254). Buparvaquona é um composto naftoquinona utilizado contra a teileriose tropical em gado (255), seu mecanismo de ação está associado ao bloqueio de canal de cálcio e já foi descrito contra *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (256). O benznidazol, presente entre os compostos referência que compõem a biblioteca, não foi selecionado para nenhuma cepa testada já que, como esperado, atingiu valores de atividade normalizada menores que 80% sob a concentração de 20 µM testada.

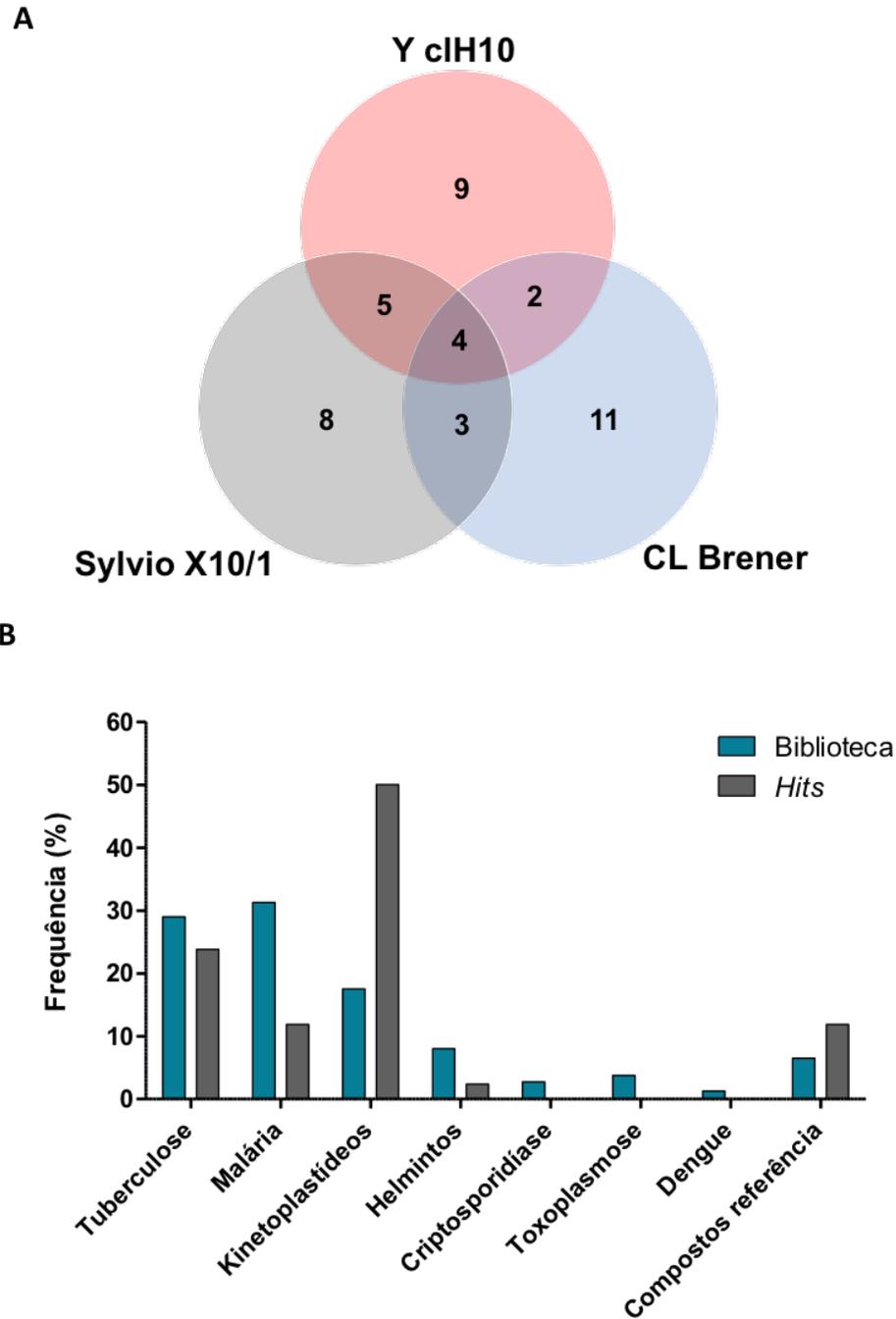


Figura 29. Perfil dos compostos selecionados na triagem da Pathogen Box para diferentes cepas de *T. cruzi*. **A.** Diagrama de Venn mostrando o número de compostos *hits* selecionados contra cada cepa de *T. cruzi* Y clH10 (vermelho), Sylvio X10/1 (preto) e CL Brener (azul), números nas áreas de intersecção revelam a quantidade de *hits* comuns entre as cepas. **B.** Gráfico mostra a frequência (eixo Y, em %) dos compostos em cada grupo de classificação da biblioteca (eixo X), barras azuis indicam frequência da biblioteca e as barras cinzas indicam a frequência dos compostos entre os *hits* selecionados.

Os compostos que mais se destacaram desta triagem foram os quatro comuns para as três cepas testadas: MMV689028, MMV689029, MMV688958 e MMV688795, todos originados da porção da biblioteca relacionada com kinetoplastídeos (**figura 29A** e **tabela 16**). Os compostos MMV689028 e MMV689029 são benzil-piperazinas que tiveram sua atividade primeiramente identificada no programa de triagem de compostos anti-kinetoplastídeos da farmacêutica GSK (153). MMV689028 apresentou atividade elevada contra CL Brener e Y clH10 (108,6 e 93,6%, respectivamente) e uma atividade moderada em Sylvio X10/1 (82,6%); um perfil semelhante foi observado para o composto análogo MMV689029, com 106,9, 91,2 e 85,3% de atividade contra CL Brener, Y clH10 e Sylvio X10/1. Os compostos MMV688958 e MMV688795 são quimicamente relacionados com o grupo dos 2-aryl axazólico, que possui atividade conhecida contra *T. b. rhodesiense* (257), no entanto, o alvo terapêutico dessas moléculas permanece desconhecido. Estes compostos foram originalmente identificados com atividade anti-*T. brucei* e anti-*T. cruzi* durante uma campanha de otimização de compostos *leads* contra *T. b. brucei* (258); neste estudo, as atividades de MMV688958 e MMV688795 foram mais reduzida contra Sylvio X10/1 (78,4 e 79,4%, respectivamente), quando comparadas com as atividades de MMV689028 e MMV689029. Por outro lado, MMV688958 mostrou-se proporcionalmente mais eficaz contra Y clH10 (100,1%), sendo o *hit* com maior atividade nessa cepa e o segundo mais eficaz contra CL Brener (110,2%) (**tabela 16**); o composto MMV688795 apresentou 91,9 e 101,2% de atividade normalizada contra Y clH10 e CL Brener, respectivamente.

Esses compostos também apresentaram um perfil promissor de atividade contra *T. cruzi* e *T. brucei* na triagem desta mesma biblioteca *Pathogen Box* por outro grupo (259); porém, o teste destes compostos contra diversas cepas de *T. cruzi* nunca havia sido realizado anteriormente.

Tabela 17. Lista dos compostos hits selecionados na biblioteca Pathogen Box com os valores de atividade normalizada (em %) para cada cepa de *T. cruzi* testada. Valores marcados referem-se aos hits exclusivos de uma única cepa (azul), em comum para duas cepas (amarelo) e em comum entre as três cepas (verde). Valores escritos em vermelho não passaram pelo critério de taxa de célula > 0,8. Legenda indicativa da classe dos hits à direita.

Composto	Atividade normalizada (%)			
	Y clH10	CL Brener	Sylvio X10/1	
MMV688796	94,0	109,9	98,0	
MMV688122	105,4	101,3	66,0	
MMV032967	95,3	41,2	75,2	
MMV011903	76,0	104,5	85,4	
MMV687706	104,4	93,7	80,1	
MMV687776	90,7	106,5	13,3	
MMV687749	96,5	75,1	74,3	
MMV676401	86,2	99,8	71,1	
MMV689060	91,2	86,0	11,0	
MMV689028	93,6	108,6	82,6	
MMV688846	98,0	107,4	101,0	
MMV688943	93,6	82,0	70,0	
MMV689029	91,2	106,9	85,3	
MMV688467	93,3	93,1	77,3	
MMV688942	90,9	90,6	79,9	
MMV676048	88,4	61,4	72,2	
MMV687703	97,9	85,1	58,1	
MMV687248	90,0	106,7	68,0	
MMV688125	89,8	52,3	37,0	
MMV688274	96,1	88,2	68,7	
MMV690103	93,5	105,3	86,7	
MMV688124	91,9	28,0	33,1	
MMV688514	75,8	104,8	77,0	
MMV688797	87,8	96,6	82,4	
MMV688756	6,5	110,1	10,0	
MMV690102	95,2	84,0	85,0	
MMV689709	79,1	97,3	76,4	
MMV688279	94,2	99,1	95,3	
MMV688936	90,0	23,0	60,2	
Posaconazol	92,4	74,3	63,3	
Clemastina	102,3	111,7	70,7	
MMV024937	95,8	62,7	92,6	
MMV688958	100,1	110,2	78,4	
Buparvaquona	87,8	102,7	65,4	
MMV663250	98,5	103,6	90,6	
MMV676159	87,3	95,4	77,1	
MMV688795	91,9	102,1	79,4	
Nifurtimox	85,6	94,8	82,2	
MMV689243	72,2	86,0	80,6	
MMV688415	86,5	107,2	75,7	
Miltefosina	72,2	97,9	70,7	
MMV688550	100,2	103,2	87,8	

Kinetoplastídeos
Tuberculose
Malária
Filariose linfática
Composto Referência

Até o momento, apenas o estudo da triagem primária foi concluído em relação ao teste da biblioteca Pathogen Box contra cepas de *T. cruzi*, pretende-se confirmar a

atividade dos *hits* selecionados com intuito de obter os valores de EC₅₀, CC₅₀ e atividade máxima, além da taxa de confirmação para cada cepa testada. Os dados também serão comparados com resultados obtidos na triagem contra *L. infantum* e *L. donovani* (estudo em andamento).

Apesar de preliminares, os resultados já apontaram para uma divergência no perfil de atividade da biblioteca de compostos entre diferentes cepas de *T. cruzi*, mesmo quando testada sob uma concentração mais elevada (20 µM) e sendo composta por fármacos referência ou moléculas com atividade anti-*T. cruzi* conhecidas, o que pode impactar na seleção de compostos *hits*. Os resultados da triagem permitiram a identificação de quatro compostos eficazes contra *T. cruzi*, já identificados em outras campanhas de triagem; porém, a identificação do amplo espectro de ação dessas moléculas contra as cepas de *T. cruzi* aqui testadas reforça ainda mais o interesse nos compostos como potenciais quimioterápicos antichagásicos.

Parte III: Estudos de resistência do *T. cruzi* ao ravuconazol: caracterização fenotípica e identificação de uma nova mutação na CYP51

4.6. Obtenção e caracterização fenotípica dos diferentes clones H10

Com o objetivo de caracterizar melhor a resistência de *T. cruzi* a compostos azólicos, um estudo de seleção de resistência ao ravuconazole foi iniciado por nosso grupo de pesquisa no Institut Pasteur Korea. Para tanto, foi utilizado um clone derivado da cepa Y por diluição limitante, aqui chamado de Y clH10.

O Y clH10 foi cultivado na presença de ravuconazol (RVL) sob concentrações crescentes; tentou-se manter o *fitness* (capacidade de invasão celular, de replicação das formas de epimastigota e amastigota e de diferenciação *in vitro*) do clone ao alternar a pressão do composto ao longo da infecção contínua das células *in vitro* (pressão *on/off* do fármaco). Após aproximadamente 12 meses em cultura sob pressão *on/off* de RVL, foi possível recuperar diferentes estoques populacionais do Y clH10 (**tabela 4**). Nosso trabalho se iniciou a partir da caracterização fenotípica do clone parental, sensível ao RVL, e os clones derivados após o processo de seleção de resistência, O clone H10-R

tem crescimento relativamente lento em comparação com H10-S e H10-LT, os clones resistentes também apresentam uma capacidade de infecção reduzida (**figura 30**). Além disso, observamos que o período de recuperação foi ainda maior para os clones H10 que foram cultivados em níveis intermédios de resistência (2 - 256 nM), esses clones (e também o clone que cresceu sob 1 μ M) apresentaram crescimento menos estável e menor capacidade de infectividade do que o padrão H10-R, que cresceu sob 500 nM (dados não mostrados). Portanto, H10-R foi selecionado como clone padrão para avaliação no ensaio de alto conteúdo.

A avaliação multiparamétrica da infecção *in vitro* de cada clone H10 em células hospedeiras U2OS é detalhada na **figura 30**. A taxa de infecção do clone H10-R foi pelo menos 2 vezes menor do que o obtido para H10-S e H10-LT; um resultado semelhante pode ser observado para H10-R-NP (**figura 30B**). Enquanto o número médio de amastigotas por célula infectada foi significativamente menor para o clone H10-R quando comparado com os clones H10-S e H10-LT, mas não se comparado com H10-R-NP, mesmo considerando que estes clones foram adicionados no ensaio a uma densidade de maior de tripomastigota/mL (**figura 30C**). Conclusão semelhante pode ser assumida em relação ao número total de amastigotas, uma vez que este parâmetro para o clone H10-R é significativamente inferior ao observado para H10-LT (**figura 30D**). A lise de células U2OS relativamente alta é uma consequência direta do índice de infectividade superior e maior crescimento intracelular dos clones H10-S e H10-LT (**figura 30B e 30C**), portanto, o número total de células hospedeiras é reduzido para esses clones quando comparado ao H10-R e H10-R-NP, após 120 h de infecção (**figura 30A**). Os resultados das avaliações intracelulares corroboram os dados obtidos a partir de infecções de LLC-MK₂ pelos clones H10 na rotina de cultivo em frascos de cultura: maior proporção de tripomastigotas no sobrenadante de cultura observada para H10-LT e H10-S ($> 2,5 \times 10^7$ tripomastigotas/mL) enquanto uma relação menor foi observada para H10-R ($< 1,0 \times 10^7$ tripomastigotas/mL), bem como um pico de tripomastigotas no sobrenadante relativamente tardio para este último clone, evidenciando a taxa de replicação limitada do clone resistente a RVL. A diferença notável entre os estoques H10-S e H10-LT provavelmente deve-se à maior adaptação deste último nas culturas *in vitro* - dado seu longo período em cultivo contínuo -. A semelhança das condições de infecção entre H10-

R-NP e H10-S sugere que este estoque derivado de H10-R pode ter recuperado *fitness* na ausência de pressão de fármacos.

Durante a tentativa de diferenciar os tripomastigotas dos clones (derivados de cultura de tecido – TCT) em formas epimastigotas, observou-se que o processo de diferenciação de H10-R foi nitidamente mais lento do que o observado para os clones sensíveis, clones H10-S e H10-LT. Um período de dois a três dias foi suficiente para a diferenciação completa de clones sensíveis H10-S e H10-LT, um tempo esperado para a cepa Y de *T. cruzi* (260). O período de diferenciação é seguido por uma fase *lag* (duração 2 – 4 dias), durante a qual não ocorre multiplicação, seguido de multiplicação até a densidade de $\sim 1 \times 10^7$ epimastigotas / mL (**figura 31D**). Em relação aos clones resistentes, foram necessários seis dias para a diferenciação completa dos tripomastigotas em epimastigotas, além de uma fase *lag* mais longa (pelo menos 6 dias); além disso, a densidade de pico após a fase *lag*, tanto para H10-R quanto para H10-R-NP, foi inferior do que em H10-S e H10-LT (**figura 31D**) – apesar de não haver diferença estatística entre os pontos distintos da curva de crescimento -. Os clones resistentes a RVL avaliados apresentaram um tempo de duplicação de epimastigota superior ao calculado para H10-S e H10-LT (**figura 31B**).

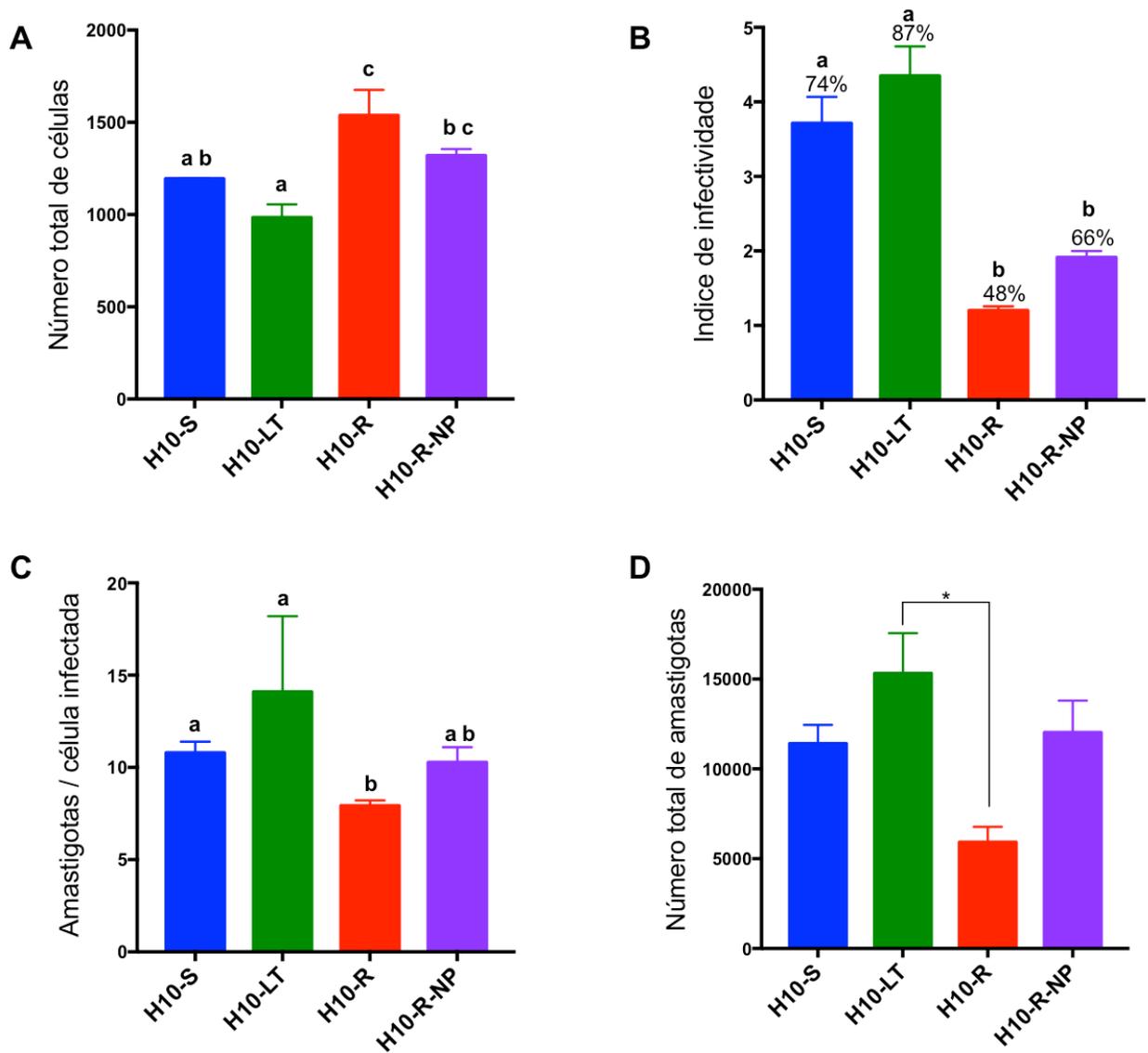


Figura 30. Avaliação fenotípica da infecção por clones de *T. cruzi* resistentes e susceptíveis ao ravuconazol. Infecção da linhagem de células U2OS foi avaliada por HCA a 120 h pós-infecção para os clones sensíveis (H10-S, azul e H10-LT, verde) e resistentes (H10-R, vermelho e H10-R-NP, roxo). **A.** Número total de células hospedeiras U2OS; **B.** Índice de infectividade: um parâmetro que considera a razão entre a taxa infecção e o número de parasitas semeados para cada clone; a proporção média de células infectadas em relação a população total de células é mostrada acima das barras (em %); **C.** O número médio de amastigotas por célula infectada; **D.** Número total de amastigotas. Os valores referem-se a médias (barras) \pm desvio padrão (barras de erro) obtidos em dois experimentos independentes; letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os valores, enquanto * indica diferença estatística por ANOVA (*one-way*, $p < 0,001$).

Curiosamente, o processo de diferenciação não ocorreu na presença de 500 nM de ravuconazol (RVL) (dados não apresentados), mas o crescimento pós-diferenciação de epimastigotas de clones H10-R na presença de RVL 500 nM não afetou significativamente o seu crescimento, quando comparado com H10-R e H10-R-NP não tratados. O fato da diferenciação não ocorrer na presença da fármaco sugere que a resistência fenotípica conferida pela mutação parece não se expressar durante a epimastigogênese ou as células dos parasitas resistente não são metabolicamente competentes para suprir um grande recrutamento de ergosterol que ocorre durante o remodelamento da membrana celular, fenômeno análogo a crítica reorganização dos esteróis na membrana plasmática de fungos (261,262) e na embriogênese de plantas (263).

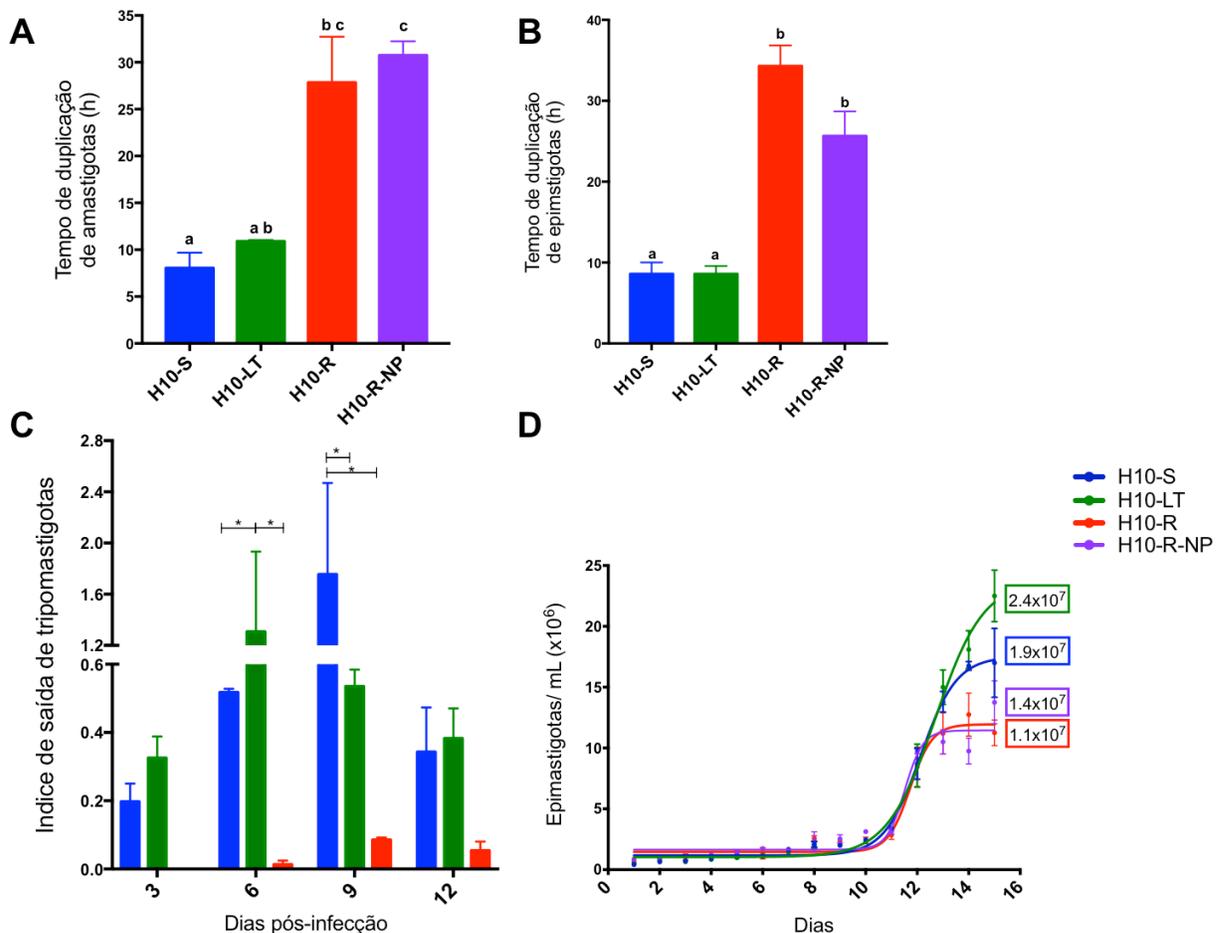


Figura 31. (Página anterior) A resistência ao ravuconazol correlaciona-se com o crescimento reduzido em amastigotas e epimastigotas. A. Tempo de duplicação de amastigotas (em horas, eixo Y), baseado em crescimento por 96 h para cada clone H10 (eixo X) **B.** Tempo de duplicação de epimastigotas (em horas, eixo Y), baseado em crescimento de 48 h dentro da fase exponencial de cada clone (eixo X). **C.** Índice de liberação de tripomastigotas: o número total de tripomastigotas de cultura recuperados em cada clone (por mL) foi dividido pelos valores de MOI utilizados para os clones: 20 (H10-S e H10-LT) e 40 (H10-R). Eixo Y: índice de liberação de tripomastigotas. Eixo X: dias após infecção dos frascos. **D.** Curva de crescimento de epimastigotas: os parasitas diferenciados de clones H10 distintos foram contados diariamente (a densidade inicial para cada clone foi de $1,0 \times 10^5$ epimastigotas / mL). Eixo Y: indica a densidade do epimastigote por mililitro de cultura ($\times 10^6$); Eixo X: dias de contagem dos clones. As curvas coloridas indicam média (pontos) da contagem diária distinta dos clones H10: H10-S (azul), H10-LT (verde), H10-R (vermelho) e H10-R-NP (roxo). As caixas retangulares destacam o crescimento máximo para cada clone. Barra de erro indica o erro padrão de contagens independentes. Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre os valores (dentro do tratamento com o mesmo composto), enquanto * indica diferença estatística por ANOVA (*one-way*, $p < 0,001$).

4.7. Teste de susceptibilidade dos clones H10 a diferentes compostos anti-*T. cruzi*

Utilizando a metodologia de HCA já descrita, a susceptibilidade dos diferentes clones ao RVL foi avaliada por meio da quantificação da infecção intracelular dos parasitas 96 h após adição do composto. O fármaco atingiu uma atividade normalizada máxima (MA) relativamente alta para os clones H10-S e H10-LT - medindo 96,8% e 81,8%, respectivamente (**tabela 17**), enquanto um desvio nítido pode ser notado na curva da atividade para H10-R e H10-R-NP (**figura 32**), já que para estes clones, é necessária uma maior concentração molar de RVL para atingir valores de atividade máxima inferiores de 62,2% e 72%, respectivamente. Os valores médios do EC_{50} de RVL obtidos para clones resistentes são pelo menos 1.600 vezes maiores do que a média dos clones susceptíveis, em 96 h de exposição ao composto (**tabela 17**). Conforme já descrito, RVL é um agente de ação lenta (197,205), logo, a atividade do fármaco em 48 h de exposição não atingiu 50% de atividade máxima para nenhum dos clones, não gerando, portanto, valores de EC_{50} .

Tabela 18. Atividade do ravuconazol contra diferentes clones H0 de *T. cruzi* em diferentes tempos de exposição (48, 96 e 120 horas). Comparação entre valores EC_{50} (em nanomolar) e atividade máxima (MA, em%) ao longo do tempo.

Clones	48 h		96 h		120 h	
	EC_{50} , nM	MA (%)	EC_{50} , nM	MA (%)	EC_{50} , nM	MA (%)
H10-S	-	48,1	4,7*	96,8	2,52 ± 0,9	97,8
H10-LT	-	47,3	4,1*	81,8	1,47 ± 0,12	84,2
H10-R	-	32,1	6.944*	62,2	13.740 ± 6.775	89,4
H10-R-NP	-	47,5	7.029 ± 4.743	72	3.685 ± 180,3	93,5

* dados foram obtidos em um único experimento.

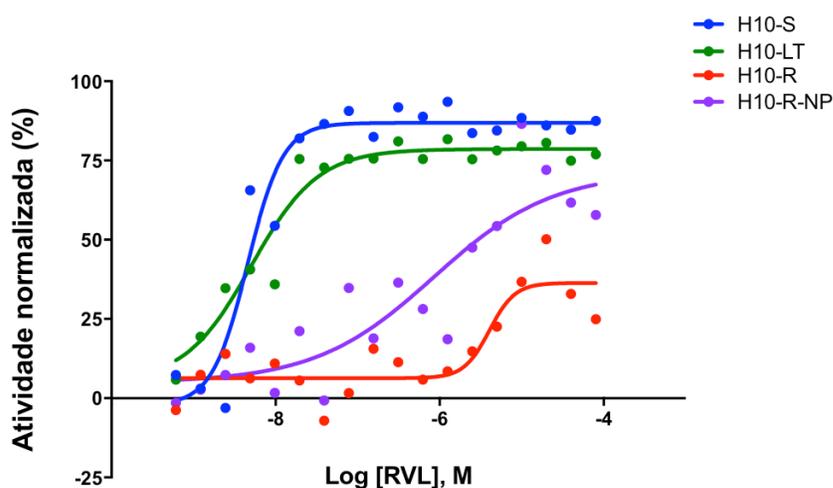


Figura 32. Suscetibilidade dos clones H10 ao ravuconazol. A atividade do ravuconazol foi avaliada em um teste dose-resposta após 96 h de exposição ao composto. Eixo Y: atividade normalizada (em %) de RVL contra clones H10 (H10-S - azul, H10-LT - verde, H10-R - vermelho e H10-R-NP - roxo). Eixo X: Log da concentração de RVL. As curvas foram traçadas com base na média (pontos) para cada clone de dois experimentos independentes. Os valores de ajuste da curva (R^2) para H10-S, H10-LT, H10-R e H10-R-NP foram respectivamente 0,80, 0,55, 0,43 e 0,75.

Em seguida, os clones foram testados quanto à sua susceptibilidade a outros compostos anti-*T. cruzi*. Todos os clones foram parcialmente resistentes ao benznidazol, como mostrado na **tabela 18** e na **figura 33**. Os valores de EC_{50} para todos os clones H10 variaram de 15 a 70 μ M; enquanto os valores máximos de atividade variaram de

72,2 a 89,6%. Os clones também foram parcialmente resistentes ao nifurtimox, embora em menor grau, com valores de EC_{50} variando de 0,9 a 9,3 μM e atividades máximas superiores a 85% (**tabela 18**). Em contraste, H10-R e H10-R-NP mostraram valores de EC_{50} significativamente maiores para posaconazol quando comparados aos clones H10-S e H10-LT (**tabela 18 e figura 33**). Adicionalmente, este composto não atingiu 50% de atividade contra os clones resistentes, gerando assim valores máximos de 48,1% e 26,6% para H10-R e H10-R-NP, respectivamente. Embora a RVL tenha sido claramente mais potente contra os clones sensíveis (H10-S e H10-LT) do que contra os resistentes (H10-R e H10-R-NP), não houve diferenças expressivas na eficácia do composto (isto é, atividade máxima) entre os clones; ao contrário da atividade do PSL, que foi menos potente e menos eficaz contra os clones resistentes, quando comparados aos clones sensíveis (**tabela 18 e figura 33**). Vale ressaltar que a resistência parcial ao benznidazol e ao nifurtimox foi observada para todos os clones, independentemente da sua resistência ao ravuconazol, e, portanto, pode-se supor que a resistência parcial ao benznidazol e ao nifurtimox já estavam presentes nesses clones antes da seleção da resistência ao ravuconazol. O clone H10 foi derivado da cepa Y, que demonstrou ser parcialmente resistente ao benznidazol (215). Conforme já discutido neste trabalho, a resistência parcial não é uma característica presente em todos os estoques de cepa Y (206), o que reforça a hipótese da ocorrência de variabilidade fenotípica (e genética) considerável entre os estoques de cepa Y presente em diferentes laboratórios. Esta resistência foi relacionada a uma mutação no transportador ABC TcABCG1, que está associada ao grupo filogenético TcI, e ao grande número de cópias transcritas do transportador (215); pode-se sugerir que o clone H10 (e seus estoques) possa ter o transportador ABC mutado presente em parasitas TcI. Além disso, estudos com *T. cruzi* resistentes (obtidos em laboratório) ao BZL revelaram mutações na enzima nitroreductase, TcNTR (210,213). A perda de um dos genes que codificam TcNTR levou a uma resistência à BZL, bem como à resistência cruzada ao nifurtimox (68).

Tabela 19. Comparação entre valores de EC₅₀ (em nM para posaconazol e μM para os demais) e atividade máxima (MA, em%) para compostos referência benznidazol, nifurtimox e posaconazol contra clones H10.

Clone	Benznidazol		Nifurtimox		Posaconazol	
	EC ₅₀ , μM	MA (%)	EC ₅₀ , μM	MA (%)	EC ₅₀ , nM	MA (%)
H10-S	47.7 ± 2.5	89.6	4.3 ± 3.3	92	19.8 ± 10.2	90.1
H10-LT	15*	72.2	9.3 ± 7.5	87.9	31.4 ± 18.7	79.3
H10-R	70.4 ± 12.4	86.3	4.5 ± 2.4	94.1	ND	48.1
H10-R-NP	24 ± 4.1	77.3	0.9 ± 0.2	99.2	ND	26.6

* o valor foi obtido apenas em uma de duas repetições. ND: os valores não foram determinados

A cepa Y de *T. cruzi* possui dois genes CYP51: A e B, que não são 100% idênticos (178) e podem apresentar níveis distintos de expressão durante os diferentes estágios do ciclo de vida do parasita. Assim, podemos especular que, nos clones H10-R, apenas um gene mutado CYP51 esteja envolvido na biossíntese de ergosterol durante o crescimento intracelular, enquanto outra sequência intacta da CYP51 está associada a outros processos metabólicos, como na diferenciação para epimastigotas pode estar intacta, por exemplo.

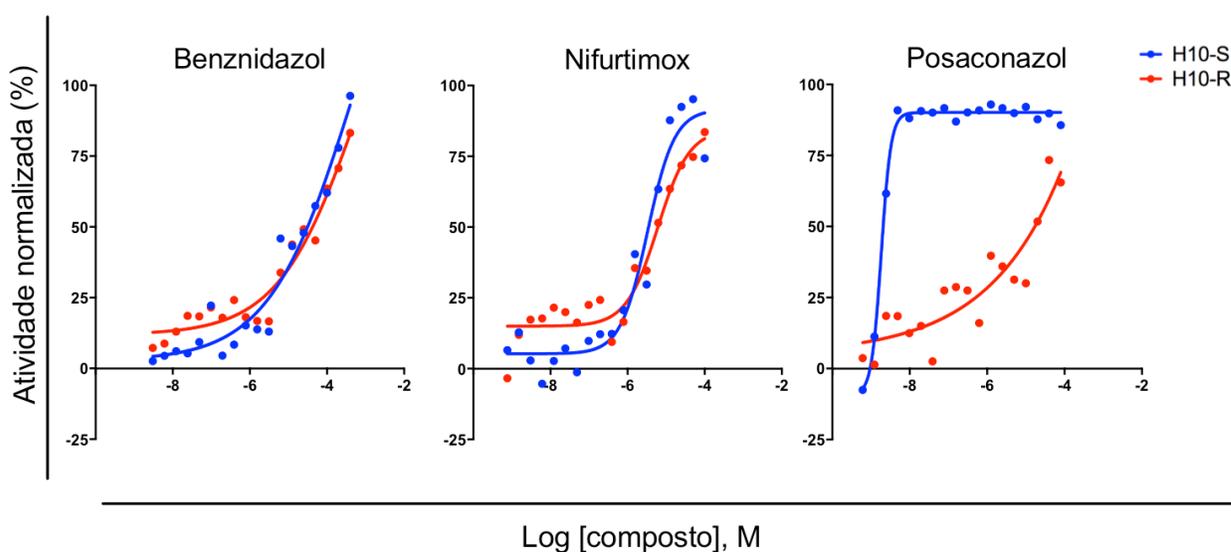


Figura 33. (Página anterior) O clone H10 resistente ao ravuconazol também é resistente ao posaconazol. Eixo Y: atividade normalizada (em %) dos compostos de referência BZL e NFX e do composto de triazol PSL contra os clones H10-S (curva azul) e H10-R (curva vermelha). As curvas foram traçadas com base na média (pontos) para cada clone em 2 experimentos independentes. Os valores de ajuste da curva (R^2) para H10-S e H10-R foram respectivamente para cada gráfico composto: BZL (0,87 e 0,62); NFX (0,88 e 0,68) e PSL (0,92 e 0,61).

O perfil de atividade dos compostos (BZL, NFX, RVL e PSL) foi mantido mesmo após a submeter os clones H10 no ciclo *in vitro* completo: da transformação do tripomastigota para epimastigota, passando pela diferenciação para tripomastigotas metacíclicos e finalmente infecção de células hospedeiras (**tabela 19**). Estes resultados sugeriram que as mudanças moleculares que levam às alterações fenotípicas (resistência aos azóis) eram de natureza genética, como uma mutação.

Tabela 20. Resistência aos compostos triazóis é conservada mesmo após passagem dos clones pelo ciclo completo *in vitro* (epimastigogênese seguida de metaciclogênese e infecção de células hospedeiras). Dados referem-se à potência - EC_{50} em micromolar para benznidazol (BZL) e nifurtimox (NFX) e em nanomolar para posaconazol (PSL) e ravuconazol (RVL) -, dados de eficácia ela atividade máxima (MA, em %).

Clone	BZL		NFX		PSL		RVL	
	EC_{50} , μM	MA (%)	EC_{50} , μM	MA (%)	EC_{50} , nM	MA (%)	EC_{50} , nM	MA (%)
H10-S	31.5 ± 1.6	91	3.7 ± 0.9	104	2.6 ± 0.9	106	0.8 ± 0.1	93.5
H10-LT	7.8 ± 1.3	94	2.8 ± 0.2	98	1.7 ± 0.6	102	1.2*	95
H10-R	83.2 ± 41	75	3.4 ± 0.5	91	7,640 ± 1,031	65	5,861 ± 228	74
H10-R-NP	90.2 ± 25.2	83	3.8 ± 1.3	85	5,150 ± 516.2	74	11,860 ± 2,072	68

* o valor foi obtido apenas em uma de duas repetições. ND: os valores não foram determinados

4.8. Ensaio de cinética de morte (*Time-Kill*) com clones H10 tratados com compostos referência

A cinética de morte *in vitro* de clones de H10 por compostos nitroheterocíclicos (BZL e NFX) e compostos de triazóis (PSL e RVL) foi avaliada através do ensaio tempo

de morte (*time-kill*), onde a taxa de infecção (normalizada pelos controles) foi determinada após a exposição sob várias concentrações dos compostos, a cada 24 h, durante um período total de 120 h.

O BZL exibiu um perfil de cinética de atividade similar e dose-dependente entre todos os clones avaliados (**figura 34**), e apenas as duas maiores concentrações (200 e 100 μM) reduziram a taxa de infecção para menos de 30% após 96 h ou mais, em ambos os clones; estes dados confirmam o perfil já descrito de resistência/tolerância parcial ao BZL. Uma cinética de morte uniforme similar foi observada para NFX contra os clones: H10-S parece ser mais suscetível, pois concentrações mais altas de NFX reduziram as taxas de infecção para níveis indetectáveis após 96 h de exposição ao composto, ao contrário de H10-R; no entanto, a variação da atividade nas concentrações mais altas (25 e 12,5 μM) é provavelmente causada por ação de citotoxicidade do composto. As **tabelas 20 e 21** fornecem mais detalhes sobre a cinética de morte com valores médios da taxa de infecção para as concentrações efetivas dos compostos contra os clones H10-S e H10-R (dentro do curso do tempo analisado), é interessante notar que apenas a maior concentração de NFX (25 μM) causou redução da taxa de infecção para níveis indetectáveis em 96 e 120 h de exposição.

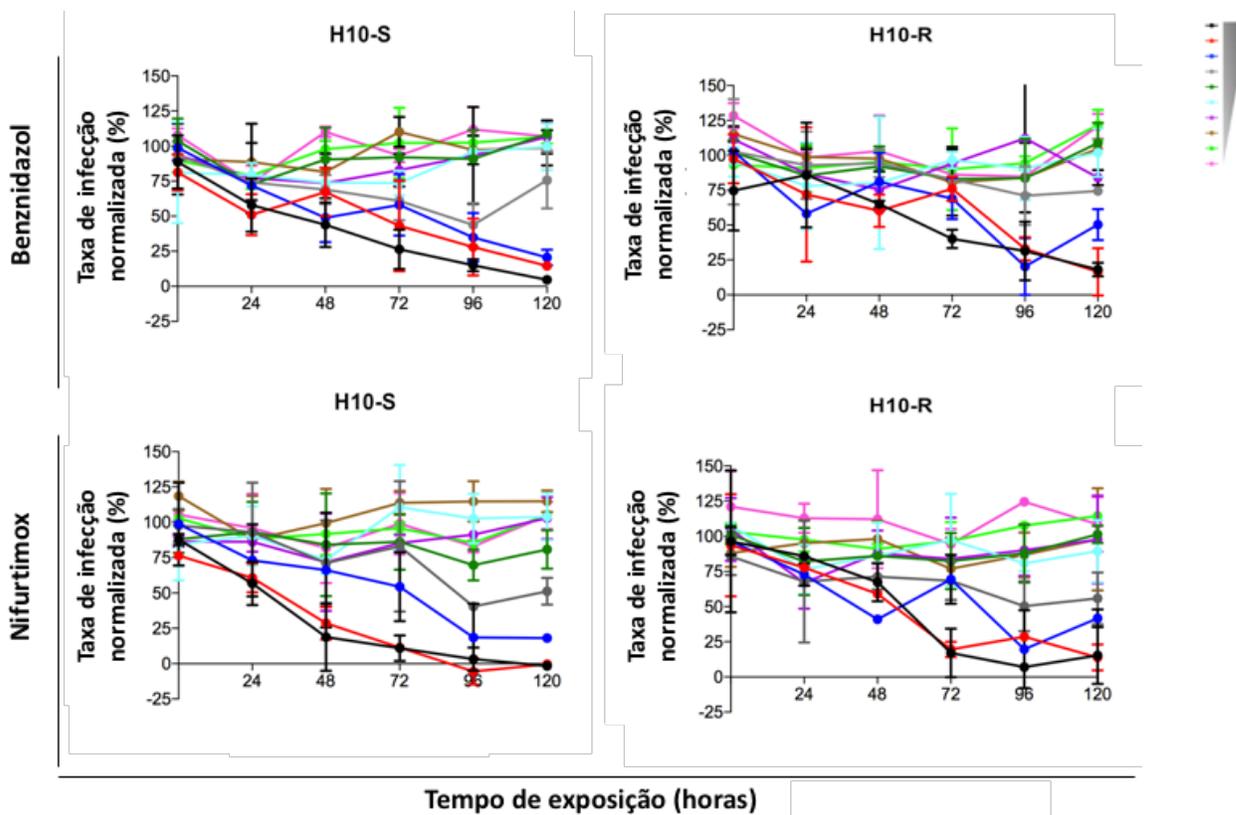


Figura 34. Ensaio de cinética de morte (time-Kill) com compostos nitro-heterocíclicos contra os diferentes clones H10. Eixo Y: taxa de infecção normalizada (%). Eixo X: tempo de exposição composto (período, em horas). Gradiente de concentração do composto (à direita) indica os valores representados por cada curva. As 10 curvas de concentração mostradas são: 200, 100, 25, 6,25, 0,78, 0,39, 0,09, 0,02, 0,006, 0,003 μM para BZL; 25, 12,5, 6,25, 1,56, 0,39, 0,09, 0,02, 0,006, 0,001 e 0,0007 μM para NFX. Os pontos indicam a média de dois experimentos independentes, as barras de erro indicam desvio padrão.

Já em relação ao composto PSL, este exibiu um perfil de cinética de morte distinto entre os clones (**figura 35**): para o clone H10-S, todas as concentrações testadas reduziram a taxa de infecção para valores inferiores a 50% após 96 h de exposição, exceto pelas duas menores concentrações; no entanto, apenas as duas concentrações mais altas exerceram o mesmo efeito para H10-R, dentro desse mesmo período. Um perfil equivalente foi observado para RVL: uma mudança clara do padrão é notada entre clones suscetíveis e resistentes: enquanto a maioria das concentrações testadas apresenta maior atividade ascendente em relação ao tempo no clone H10-S (ou seja, reduzindo progressivamente a proporção de infecção), H10-R foi suscetível apenas para as concentrações mais altas de RVL e a eliminação completa da taxa de infecção não é alcançada mesmo após 120 h de exposição ao composto.

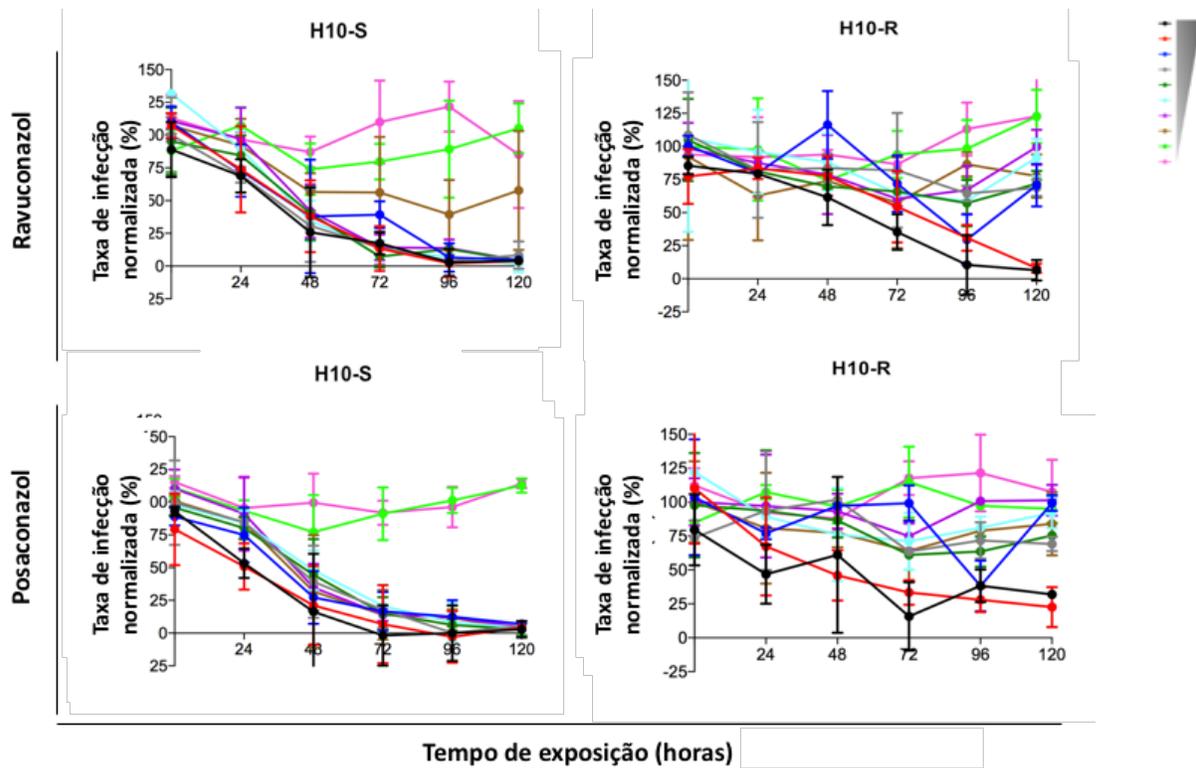


Figura 35. Ensaio de cinética de morte (time-Kill) com compostos triazóis contra os diferentes clones H10. Eixo Y: taxa de infecção normalizada (%). Eixo X: tempo de exposição composto (período, em horas). Gradiente de concentração do composto (à direita) indica os valores representados por cada curva. As 10 curvas de concentração mostradas são: 4.000, 2.000, 500, 125, 31.3, 15.6, 3.91, 1.95, 0.12, 0.06 nM para RVL e PSL. Os pontos indicam a média de dois experimentos independentes, as barras de erro indicam desvio padrão.

Tabela 21. Faixa de concentração dos compostos e média da taxa de infecção normalizada (%) em 72, 96, e 120 h de exposição contínua do clone H10-S aos compostos benznidazol, nifurtimox, posaconazol e ravuconazol.

Clone H10-S	Concentração (M)	Média de taxa de infecção (%)		
		72 h	96 h	120 h
Benznidazol	$2,0 \times 10^{-4}$	26,4 ± 14	15 ± 4,2	4,7 ± 0,4
	$2,5 \times 10^{-5}$	58 ± 22	35 ± 17,4	20,5 ± 5,5
	$6,2 \times 10^{-6}$	61 ± 14	43,8 ± 15,7	75,7 ± 20
Nifurtimox	$2,5 \times 10^{-5}$	11,4 ± 1.8	-5,5 ± 9,2	-0,4 ± 3,2
	$1,2 \times 10^{-5}$	14,5 ± 5.1	1,8 ± 0.7	7,2 ± 10,2
	$6,2 \times 10^{-6}$	54,3 ± 24.4	18,5 ± 24	18 ± 0,3
Posaconazol	$5,0 \times 10^{-7}$	16,6 ± 14.7	12,5 ± 1,6	7,1 ± 2,5
	$3,1 \times 10^{-8}$	15 ± 12.3	6,3 ± 4,4	2,8 ± 4,6
	$3,9 \times 10^{-9}$	14,1 ± 4.8	6,7 ± 5,9	4,6 ± 1,7
Ravuconazol	$5,0 \times 10^{-7}$	39,3 ± 10.3	6,5 ± 10,8	4,8 ± 1,9
	$3,1 \times 10^{-8}$	7,3 ± 4.5	13 ± 4,4	4,2 ± 3,1
	$3,9 \times 10^{-9}$	14,3 ± 9,7	13,7 ± 6,6	4,4 ± 3,4

Dados representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes

4.9. Teste com outros compostos azólicos e não-azólicos inibidores da CYP51

Após estudarmos o perfil de resistência do H10-R aos compostos triazóis RVL e PSL, investigamos se este clone também era resistente a outros azóis. Fluconazol (FCL), itraconazol (ITL), cetoconazol (KTL) e voriconazol (VRL) foram testados contra clones H10 e os resultados revelaram que o clone também era resistente a estes compostos. O FCL exibiu um valor máximo de atividade para H10-R (MA: 44%), aproximadamente 30% inferior ao atingido em H10-S (MA: 72,9%), o composto também apresentou menor potência nos clones resistentes (**tabela 25**). O ITL apresentou maiores valores de atividade máxima contra H10-S e H10-R (MA = 103,2% e 95,7%, respectivamente), mas

o composto foi 34,6 vezes menos potente contra H10-R do que contra H10-S - a mesma comparação foi observada nos clones H10-LT e H10-R-NP (dados não mostrados).

KTL e VRL também apresentaram alta potência contra H10-S ($EC_{50} < 0,5 \mu\text{M}$), mas os valores de EC_{50} foram maiores para clones resistentes (quando gerados), a eficácia de KTL e VRL também foi reduzida para H10-R, em comparação com clones susceptíveis (**tabela 25**).

Tabela 22. Faixa de concentração dos compostos e média da taxa de infecção normalizada (%) em 72, 96, e 120 h de exposição contínua do clone H10-R aos compostos benznidazol, nifurtimox, posaconazol e ravuconazol.

Clone H10-R	Concentração (M)	Média de taxa de infecção (%)		
		72 h	96 h	120 h
Benznidazol	$2,0 \times 10^{-4}$	40,1 ± 6,5	31,3 ± 21	18,1 ± 11,1
	$2,5 \times 10^{-5}$	69 ± 14,7	20,2 ± 12,3	15,3 ± 11,1
	$6,2 \times 10^{-6}$	82,8 ± 1,8	71 ± 21,1	64,4 ± 2,8
Nifurtimox	$2,5 \times 10^{-5}$	19,6 ± 5,5	12,5 ± 2,8	13,8 ± 9,2
	$1,2 \times 10^{-5}$	23,4 ± 0,2	24,3 ± 3,3	13,3 ± 6,8
	$6,2 \times 10^{-6}$	69,4 ± 17,4	39,8 ± 0,5	41,7 ± 6,3
Posaconazol	$5,0 \times 10^{-7}$	99,1 ± 13,2	88,2 ± 18,7	99,4 ± 5,8
	$3,1 \times 10^{-8}$	61,2 ± 2,2	63,5 ± 11,3	75,4 ± 3
	$3,9 \times 10^{-9}$	74,8 ± 9,6	100,7 ± 0,1	101,4 ± 11,4
Ravuconazol	$5,0 \times 10^{-7}$	72 ± 21,4	29,6 ± 18,7	70,8 ± 16
	$3,1 \times 10^{-8}$	66 ± 2,6	57,1 ± 17,5	71,9 ± 9,6
	$3,9 \times 10^{-9}$	60,4 ± 5,6	67,1 ± 18,2	99,6 ± 13,1

Dados representam a média ± desvio padrão de dois experimentos independentes

Outros compostos que anteriormente demonstraram atividade contra *T. cruzi* também foram testados contra os clones resistentes e sensíveis. Os fenarimóis UDD (BS967) e UDO (BS1246) também foram testados, além da anfotericina B (AMB). Estes compostos fenarimóis já foram descritos como inibidores TcCYP51 de *T. cruzi* (204,264);

a AMB, utilizada como fármaco referência no tratamento de leishmanioses, também já foi reportada com atividade anti-*T. cruzi* (265,266), mas não parece inibir a CYP51, uma vez que é provável que esta molécula se ligue ao ergosterol da membrana e forme os poros que resultam na lise celular (192,267). Imprevisivelmente, a AMB apresentou apenas uma atividade reduzida contra os clones H10 sensível e resistente, com valores máximos de atividade entre 35 - 40%, contrastando com relatórios anteriores na literatura e sugerindo que a atividade anti-*T. cruzi* da ANB pode ser cepa-específica ou estar sujeita a emergência de resistência, como discutido para o BZL.

Tabela 23. Atividade anti-*T. cruzi* da anfotericina B, azóis e fenarimóis contra os clones H10-S e H10-R.

	H10-S		H10-R	
	EC ₅₀ , µM	MA (%)	EC ₅₀ , µM	MA (%)
Anfotericina B	ND	37	ND	39,4
Fluconazol	25 ± 0,3	72.9	ND	44
Itraconazol	0,13 ± 0,02	103.2	4,5 ± 1,5	95,7
Cetoconazol	0,07 ± 0,03	83.7	19,1 ± 20,1	61
Voriconazol	0,21 ± 0,03	83.3	ND	55,9
BS0967	0,5 ± 0,4	91	1,1*	67,3
BS1246	0,2 ± 0,12	88	10,1 ± 14,3	72,7

* dados obtidos em um único experimento. ND indica que o valor não pôde ser calculado. Os dados referem-se a média ± desvio padrão obtido de dois experimentos independentes.

Em contraste, observou-se uma diferença mais acentuada na resposta dos clones sensíveis e resistentes aos inibidores azólicos e não-azólicos de CYP51. O clone H10-R apresentou resistência cruzada aos fenarimóis BS0967 e BS1246 (**tabela 25**). BS0967

apresentou um valor de EC_{50} 44 vezes maior para o clone H10-R (10,1 μ M) em comparação com o clone H10-S (0,2 μ M). Menos variação foi observada para BS1246, cuja proporção dos valores de EC_{50} foi de apenas 2,4 vezes maior para o clone H10-R quando contrastada com H10-S; no entanto, ambos os fenarimóis apresentaram eficácia reduzida contra o clone resistente, quando comparado ao clone sensível.

4.10. Identificação de uma mutação inédita na CYP51 dos clones resistentes ao ravuconazol

Uma alteração de nucleotídeos, previamente não relatada, foi identificada nos clones resistentes (H10-R), mas não nos clones sensíveis (H10-S ou H10-LT); prevê-se que isso conduza a uma alteração do aminoácido codificado na enzima TcCYP51 em uma posição crítica que interfere o acesso dos compostos ao sítio de ligação na proteína alvo – o que inibiria sua atividade catalítica (dados não mostrados por questões de sigilo). Estudos de comparação de dados genômicos obtidos por sequenciamento de nova geração e modelagem de estruturas proteicas *in silico* estão sendo conduzidos em parceria com M. Miles (LSHTM – Londres, Reino Unido) a fim de melhor elucidar a mutação encontrada e o fenômeno de resistência do *T. cruzi* aos compostos inibidores da CYP51.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com o intuito de prospectar compostos contra *T. cruzi* através de uma metodologia robusta, imparcial e biologicamente relevante, um ensaio de alto conteúdo foi desenvolvido e validado, utilizando a cepa Y infectando a célula humana de linhagem U2OS, para triagens em maior escala. Para validação do ensaio primário proposto, uma biblioteca com 1.604 amostras diversas foi submetida a triagem primária, seguida de ensaio secundário (confirmatório), no qual foi identificado e confirmado um composto análogo a auraquina D com potencial atividade anti-*T. cruzi*. O composto selecionado já foi descrito com atividade antiparasitária, porém sua atividade contra *T. cruzi* é inédita; a molécula será sintetizada em maior quantidade a fim de ser submetida a testes mais aprofundados contra outras cepas de *T. cruzi* e contra a possível estrutura alvo no

parasita. O ensaio desenvolvido foi considerado robusto e reproduzível para os padrões de *screening* fenotípico e vem sendo aplicado na triagem de bibliotecas químicas e de compostos naturais de diversos colaboradores no Brasil e no exterior; diversas colaborações realizadas durante o período deste projeto renderam publicações em periódicos especializados que podem ser consultados na seção de anexos deste trabalho.

O ensaio primário também foi adaptado e validado para diferentes linhagens celulares, como THP-1, VERO, LLC-MK₂, e L6 e também para outras cepas de *T. cruzi* pertencentes a diferentes DTUs: Sylvio X10/1, Arma13 cl1, ERA cl2, 92.80 cl2, Tula cl2 e CL Brener. Os ensaios com diferentes cepas foram validados utilizando compostos referência e testando alguns compostos mais avançados no desenvolvimento de fármacos contra doença de Chagas (*leads*), entre estes, os compostos B e J exibiram o melhor perfil de atividade contra o painel de cepas e foram superiores ao benznidazol, tanto em termos de potência quanto eficácia, contra todas as cepas testadas. Ainda em relação a diferentes cepas, a biblioteca Pathogen Box foi triada contra Sylvio X10/1, Y clH10 e CL Brener, apresentando um perfil distinto de atividade para cada uma. Dos 400 compostos testados, os compostos benzil-piperazinas MMV689028 e MMV689029 e os do grupo dos 2-aril axazólicos MMV688958 e MMV688795 foram os únicos selecionados como *hits* contra as três cepas de *T. cruzi* (1% da biblioteca); apesar de já terem atividade conhecida contra diversos kinetoplastídeos, o amplo espectro de ação dessas moléculas contra as cepas de *T. cruzi* aumenta o interesse dessa classe compostos como potenciais compostos antichagásicos. Outros 38 compostos foram selecionados como *hits* comuns entre duas cepas ou exclusivos para uma única cepa.

A fim de verificar o efeito da célula hospedeira utilizada no ensaio de alto conteúdo, e sua consequência na seleção de compostos, a biblioteca de 1.280 compostos LOPAC foi testada contra amastigotas de Y clH10 infectando células das linhagens U2OS, THP-1, VERO e L6. Os resultados da triagem primária renderam 82 compostos cuja atividade era superior a 50% de inibição e com toxicidade para células hospedeiras inferiores a 50%. A partir destes compostos, apenas dois *hits* foram comuns a todas as linhagens de quatro células (2,4%), ou seja, existe uma baixa sobreposição de compostos selecionados quando células hospedeiras distintas são utilizadas em *screening* de

compostos contra *T. cruzi*. Os ensaios confirmatórios também foram realizados contra três cepas de *T. cruzi* (Sylvio X10/1, Y clH10 e CL Brener) infectando células hospedeiras U2OS; os compostos CB1954, entecavir, FPL 64176 e AEG3482 apresentaram potência e seletividade satisfatórias em pelo menos duas cepas de *T. cruzi* testadas. Enquanto CB1954 e entecavir já foram relatados como compostos com potencial anti-*T. cruzi*, a atividade de FPL 64176 e AEG3482 contra esse parasita nunca havia sido descrita. Testados em combinação com benznidazol e posaconazol, os compostos FPL 64176 e entecavir apresentaram um perfil de interação aditiva com esses fármacos. Concluímos que os resultados originados de ensaios fenotípicos de testes de compostos contra *T. cruzi* originado de diferentes cepas ou infectando linhagens celulares distintas são extremamente variáveis. Estes testes em um painel de cepas e em linhagens de células distintas são importantes para uma seleção mais refinada de compostos de amplo espectro contra as cepas e com potencial de ação sobre diferentes células hospedeiras, o que pode prevenir falhas em etapas mais avançadas do desenvolvimento de compostos antichagásicos.

Um outro estudo focou no perfil fenotípico de clone de *T. cruzi* selecionado *in vitro* com resistência ao ravuconazol. Em comparação com o clone parental, o clone resistente apresentou redução da *fitness*, evidenciada pela redução das taxas de replicação - tanto no estágio dos mamíferos quanto nos insetos -, bem como baixa infectividade e processo lento de diferenciação em epimatigotas. Além da resistência ao ravuconazol, o clone também é resistente a outros inibidores do CYP51 (azólicos e fenarimóis), mas não ao benznidazol, ao nifurtimox, ou à anfotericina B. As alterações fenotípicas observadas nos clones resistentes não foram devidas à cultura prolongada *in vitro* e não puderam ser revertidas removendo a pressão do composto ou após completar um ciclo de vida *in vitro*. Identificamos uma mutação inédita próxima ao sítio catalítico da TcCYP51 dos clones resistentes (mas não nos clones sensíveis - dados não mostrados). Considerado os dados obtidos nos ensaios fenotípicos com os clones sensíveis e mutantes, tal mutação parece ter efeitos farmacologicamente relevantes para a atividade de compostos inibidores de TcCYP51. Esta mutação está sendo atualmente melhor caracterizada a fim de determinar seu impacto no mecanismo de ação molecular dos inibidores na TcCYP51.

Os resultados obtidos nesse trabalho mostraram a validação de um ensaio fenotípico para triagem de compostos anti-*T. cruzi* com diversas cepas e tipos de células hospedeiras; o ensaio desenvolvido contribui para uma análise mais refinada na etapa inicial de descoberta de fármacos contra *T. cruzi*. Pela sua versatilidade, robustez e precisão, o ensaio também pode ser empregado na investigação de fenômenos biológicos específicos, como o estudo de clones de *T. cruzi* resistentes ao ravuconazol e sua caracterização fenotípica, aqui descrita. Além disso, nós selecionamos e confirmamos a atividade anti-*T. cruzi* de amplo espectro de ação de alguns compostos, não só em diferentes linhagens celulares infectadas, como também contra diferentes cepas de *T. cruzi*. Estes compostos promissores destacaram-se pela boa potência e eficácia, além de seletividade em relação a célula de mamífero; essas moléculas representam alternativas viáveis para serem explorados em ensaios *in vivo* e estudos de química medicinal a fim de determinar se existe um potencial para quimioterapia antichagásica.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Cavalier-Smith T. Eukaryote kingdoms: Seven or nine? *BioSystems*. 1981;14(3–4):461–81.
2. Moreira D, López-García P, Vickerman K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: Proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54(5):1861–75.
3. Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, Lukeš J, Bass D, Bowser SS, et al. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2012;59(5):429–93.
4. D'ávila-Levy CM, Boucinha C, Kostygov A, Santos HLC, Morelli KA, Grybchukleremenko A, et al. Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(8):956–65.
5. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, et al. The trypanosomiasis. *Lancet*. 2003;362(9394):1469–80.
6. Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, et al. Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. Vol. 118, *Journal of Clinical Investigation*. 2008. p. 1301–10.
7. Bilbe G. Overcoming neglect of kinetoplastid diseases. *Science* (80-). 2015;348(6238):974–6.
8. WHO. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire [Internet]. 2016 [cited 2017 Dec 21]. p. 285–96. Available from: <http://www.who.int/wer/2016/wer9122.pdf?ua=1>
9. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1909;1(2):159–218.
10. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell D a, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009

- Nov;104(7):1051–4.
11. MARCILI A, LIMA L, CAVAZZANA M, JUNQUEIRA AC V., VELUDO HH, MAIA DA SILVA F, et al. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. *Parasitology*. 2009 May 16;136(6):641.
 12. Tibayrenc M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol*. 1998 Jan;28(1):85–104.
 13. Telleria J, Biron DG, Brizard J-P, Demettre E, Séveno M, Barnabé C, et al. Phylogenetic character mapping of proteomic diversity shows high correlation with subspecific phylogenetic diversity in *Trypanosoma cruzi*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Nov 23;107(47):20411–6.
 14. Cosentino RO, Agüero F. A simple strain typing assay for *Trypanosoma cruzi*: discrimination of major evolutionary lineages from a single amplification product. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan;6(7):e1777.
 15. Espinoza B, Solorzano-Domínguez N, Vizcaino-Castillo A, Martínez I, Elias-López AL, Rodríguez-Martínez JA. Gastrointestinal infection with Mexican TcI *Trypanosoma cruzi* strains: different degrees of colonization and diverse immune responses. *Int J Biol Sci*. 2011 Jan;7(9):1357–70.
 16. Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, Acosta N, Gaunt MW, Miles M a. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Oct;5(10):e1363.
 17. Vago a R, Andrade LO, Leite a a, d'Avila Reis D, Macedo a M, Adad SJ, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000 May;156(5):1805–9.
 18. Cura CI, Mejía-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M, Cardinal M V., et al. *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol*. 2010;40(14):1599–607.

19. Villa LM, Guhl F, Zabala D, Ramirez JD, Urrea DA, Hernández DC, et al. The identification of two *Trypanosoma cruzi* I genotypes from domestic and sylvatic transmission cycles in Colombia based on a single polymerase chain reaction amplification of the spliced-leader intergenic region. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108(7):932–5.
20. Zingales B, Miles M a, Campbell D a, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MMG, et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol*. 2012 Mar;12(2):240–53.
21. Ramírez JD, Hernández C, Montilla M, Zambrano P, Flórez AC, Parra E, et al. First Report of Human *Trypanosoma cruzi* Infection Attributed to TcBat Genotype. *Zoonoses Public Health*. 2014 Nov;61(7):477–9.
22. Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. *Trypanosoma cruzi*: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):1–12.
23. Longo DL, Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med*. 2015;373(5):456–66.
24. Leça Júnior NF, Almeida VDA, Carvalho FS, Albuquerque GR, Silva FL. First report of *Trypanosoma cruzi* infection in naturally infected dogs from southern Bahia, Brazil. *Rev Bras Parasitol veterinária = Brazilian J Vet Parasitol* {Ó}rg{ã}o Of do Col{é}gio Bras Parasitol Veterin{á}ria. 2013;22(1):182–5.
25. Gorla D, Noireau F. Geographic distribution of Triatominae vectors in America. In: *American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition*. 2017. p. 197–221.
26. Coura JR. The main sceneries of chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):277–82.
27. Kirchhoff L V., Paredes P, Lomelí-Guerrero A, Paredes-Espinoza M, Ron-Guerrero CS, Delgado-Mejía M, et al. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: Implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion*. 2006;46(2):298–304.
28. Kransdorf EP, Zakowski PC, Kobashigawa J a. Chagas disease in solid organ and

- heart transplantation. *Curr Opin Infect Dis*. 2014;27(5):418–24.
29. Sánchez LV, Ramírez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*. 2012;1–13.
 30. Herwaldt BL. Laboratory-acquired parasitic infections from accidental exposures. Vol. 14, *Clinical Microbiology Reviews*. 2001. p. 659–88.
 31. Araujo PF, Almeida AB, Pimentel CF, Silva AR, Sousa A, Valente SA, et al. Sexual transmission of American trypanosomiasis in humans: a new potential pandemic route for Chagas parasites. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(June):437–46.
 32. Mendonça PHB, Rocha RFDB da, Moraes JB de B, LaRocque-de-Freitas IF, Logullo J, Morrot A, et al. Canine Macrophage DH82 Cell Line As a Model to Study Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. *Front Immunol*. 2017 May 31;8(May).
 33. Melo RC, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol*. 1978;64(3):475–82.
 34. Jorge TCA, Barbosa HS, Moreira AL, De Souza W, Meirelles MNL. The interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with myoblasts and fibers of skeletal muscle. *Zeitschrift für Parasitenkd Parasitol Res*. 1986;72(5):577–84.
 35. Andrade LO, Galvão LMC, Nazareth M De, Meirelles SL, Chiari E, Pena SDJ, et al. Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. 2010;105(September):834–7.
 36. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012 Jun;45(3):286–96.
 37. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *Lancet*. 2010;375(9723):1388–402.
 38. WHO. Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis. 2012.
 39. Bonney KM, Engman DM. Chagas heart disease pathogenesis: one mechanism or many? *Curr Mol Med*. 2008;8(6):510–8.
 40. Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012 Jun;26(2):275–91.
 41. de Freitas VLT, da Silva SCV, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EVN, Molina

- TD, et al. Real-time PCR in HIV/Trypanosoma cruzi coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Aug;5(8):e1277.
42. Bern C, Montgomery SP. An Estimate of the Burden of Chagas Disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;30341(5):52–4.
 43. Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop*. 2010;115(1–2):22–7.
 44. Mott KE, Desjeux P, Moncayo A, Ranque P, de Raadt P. Parasitic diseases and urban development. *Bull World Health Organ*. 1990;68(6):691–8.
 45. Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012 Jun;26(2):275–91.
 46. Pereira Júnior C de B, Markman Filho B. Clinical and echocardiographic predictors of mortality in chagasic cardiomyopathy--systematic review. *Arq Bras Cardiol*. 2014;102(6):602–10.
 47. Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos AN, Heukelbach J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(2).
 48. Capuani L, Bierrenbach AL, Pereira Alencar A, Mendrone A, Ferreira JE, Custer B, et al. Mortality among blood donors seropositive and seronegative for Chagas disease (1996–2000) in São Paulo, Brazil: A death certificate linkage study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(5).
 49. Cunha-Neto E, Chevillard C. Chagas disease cardiomyopathy: Immunopathology and genetics. Vol. 2014, *Mediators of Inflammation*. 2014.
 50. WHO. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases. Vol. 3.9, *Second WHO report on neglected tropical diseases*. 2013.
 51. Lee BY, Bacon KM, Bottazzi ME, Hotez PJ. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(4):342–8.
 52. Dias JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saude Publica*. 2007;23(suppl.1):S13–22.
 53. PEREIRA L dos S, FREITAS EC, FIDALGO ASO de BV, ANDRADE MC, CÂNDIDO D da S, SILVA FILHO JD da, et al. CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL PROFILE OF ELDERLY PATIENTS WITH CHAGAS DISEASE FOLLOWED BETWEEN

- 2005-2013 BY PHARMACEUTICAL CARE SERVICE IN CEARÁ STATE, NORTHEASTERN BRAZIL. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2015;57(2):145–52.
54. Freitas EC, de Fátima Oliveira M, de Barros Vasconcelos ASO, da Silva Filho JD, Viana CEM, Gomes KCMS, et al. Analysis of the seroprevalence of and factors associated with chagas disease in an endemic area in Northeastern Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(1):44–51.
55. Dias JCP. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. In: *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007. p. 11–8.
56. Tibayrenc M, Tellería J. American Trypanosomiasis: Chagas Disease One Hundred Years of Research. *American Trypanosomiasis*. 2017. 844 p.
57. Dias JCP, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: In search of a realistic analysis. Vol. 41, *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008. p. 193–6.
58. Quijano-Hernandez I, Dumonteil E. Advances and challenges towards a vaccine against Chagas disease. *Hum Vaccin*. 2011;7(11):1184–91.
59. Beaumier CM, Gillespie PM, Hotez PJ, Bottazzi ME. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. Vol. 162, *Translational Research*. 2013. p. 144–55.
60. Jones K, Versteeg L, Damania A, Keegan B, Kendricks A, Pollet J, et al. Vaccine-linked chemotherapy improves benznidazole efficacy for acute Chagas disease. *Infect Immun*. 2018 Jan 8;IAI.00876-17.
61. Beaumier CM, Gillespie PM, Strych U, Hayward T, Hotez PJ, Bottazzi ME. Status of vaccine research and development of vaccines for Chagas disease. *Vaccine*. 2016;34(26):2996–3000.
62. Santos FLN, de Souza WV, Barros M da S, Nakazawa M, Krieger MA, Gomes Y de M. Chronic Chagas Disease Diagnosis: A Comparative Performance of Commercial Enzyme Immunoassay Tests. *Am J Trop Med Hyg*. 2016;94(5):1034–9.
63. Brasil PE, De Castro L, Hasslocher-Moreno AM, Sangenis LH, Braga JU. ELISA versus PCR for diagnosis of chronic Chagas disease: systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis*. 2010 Dec 25;10(1):337.

64. Oliveira M de F, Nagao-Dias AT, Pontes VMO de, Júnior AS de S, Coelho HLL, Coelho ICB. Tratamento Etiológico Da Doença De Chagas No Brasil. *Revpatoltrop*. 2008;37(3):209–28.
65. Dias JCP, Ramos AN, Gontijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. 2nd Brazilian Consensus on Chagas disease, 2015. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2016;49(December):3–60.
66. Urbina JA. Parasitological Cure of Chagas Disease: Is it Possible? Is it Relevant? *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1999;94(SUPPL. 1):349–55.
67. Viotti R, Alarcon de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, Lopez MC, et al. Towards a Paradigm Shift in the Treatment of Chronic Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):635–9.
68. 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 U S A*. 2008;105(13):5022–7.
69. Hall BS, Wilkinson SR. Activation of benznidazole by trypanosomal type I nitroreductases results in glyoxal formation. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(1):115–23.
70. Hall BS, Bot C, Wilkinson SR. Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites. *J Biol Chem*. 2011;286(15):13088–95.
71. Da Silva EN, Jardim GAM, Menna-Barreto RFS, De Castro SL. Anti-Trypanosoma cruzi compounds: Our contribution for the evaluation and insights on the mode of action of naphthoquinones and derivatives. Vol. 25, *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2014. p. 1780–98.
72. Boiani M, Piacenza L, Hernández P, Boiani L, Cerecetto H, González M, et al. Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against Trypanosoma cruzi: Is oxidative stress involved? *Biochem Pharmacol*. 2010 Jun 15;79(12):1736–45.
73. Maya JD, Cassels BK, Iturriaga-Vásquez P, Ferreira J, Faúndez M, Galanti N, et al. Mode of action of natural and synthetic drugs against Trypanosoma cruzi and their interaction with the mammalian host. *Comp Biochem Physiol - A Mol Integr Physiol*.

- 2007;146(4):601–20.
74. Trochine A, Creek DJ, Faral-Tello P, Barrett MP, Robello C. Benznidazole Biotransformation and Multiple Targets in *Trypanosoma cruzi* Revealed by Metabolomics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(5).
 75. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G. Annals of Internal Medicine Article Long-Term Cardiac Outcomes of Treating Chronic Chagas Disease with Benznidazole versus No Treatment. *Ann Intern Med*. 2006;
 76. Pinazo M-J, Espinosa G, Cortes-Lletget C, Posada EDJ, Aldasoro E, Oliveira I, et al. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e1965.
 77. Pérez-Molina J a, Pérez-Ayala A, Moreno S, Fernández-González MC, Zamora J, López-Velez R. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Dec;64(6):1139–47.
 78. Yun O, Lima MA, Ellman T, Chambi W, Castillo S, Flevaud L, et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Médecins Sans Frontières. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009 Jan;3(7):e488.
 79. Meeks B, Melacini PR, Pogue J, Mattos A, Lazdins J, Rassi A, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015 Sep 1;373(14):1–12.
 80. Coura JR, De Castro SL. A critical review on chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3–24.
 81. Sosa-Estani S, Segura EL. Etiological treatment in patients infected by *Trypanosoma cruzi*: Experiences in Argentina. *Curr Opin Infect Dis*. 2006;19(6):583–7.
 82. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015 Sep 1;373(14):1295–306.
 83. Botoni FA, Ribeiro ALP, Marinho CC, Lima MMO, Nunes MDCP, Rocha MOC. Treatment of chagas cardiomyopathy. *Biomed Res Int*. 2013;2013.
 84. Cancado JR. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with

- benznidazole. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2002;44(1):29–37.
85. Molina I, Gómez i Prat J, Salvador F, Treviño B, Sulleiro E, Serre N, et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014 May 15;370(20):1899–908.
 86. Castro J a, de Mecca MM, Bartel LC. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum Exp Toxicol*. 2006 Aug 1;25(8):471–9.
 87. Garcia-Bournissen F, Altcheh J, Giglio N, Mastrantonio G, Omar Della Védova C, Koren G. Pediatric clinical pharmacology studies in Chagas disease: Focus on Argentina. In: *Pediatric Drugs*. 2009. p. 33–7.
 88. Soy D, Aldasoro E, Guerrero L, Posada E, Serret N, Mejía T, et al. Population Pharmacokinetics of Benznidazole in Adult Patients with Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3342–9.
 89. Altcheh J, Moscatelli G, Mastrantonio G, Moroni S, Giglio N, Marson ME, et al. Population Pharmacokinetic Study of Benznidazole in Pediatric Chagas Disease Suggests Efficacy despite Lower Plasma Concentrations than in Adults. Dumonteil E, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 May 22;8(5):e2907.
 90. Hasslocher-Moreno AM, do Brasil PEAA, de Sousa AS, Xavier SS, Chambela MC, Sperandio da Silva GM. Safety of benznidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(5):1261–6.
 91. Altcheh J, Moscatelli G, Moroni S, Garcia-Bournissen F, Freilij H. Adverse Events After the Use of Benznidazole in Infants and Children With Chagas Disease. *Pediatrics*. 2011;127(1):e212–8.
 92. Lazzarri J, Freilij H. Tratamiento de la enfermedad de Chagas cronica en Argentina. *Rev Patol Trop*. 1998;27:11–6.
 93. Antonio Marin-Neto J, Rassi A, Avezum A, Mattos AC, Rassi A. The Benefit trial: Testing the hypothesis that trypanocidal therapy is beneficial for patients with chronic Chagas heart disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104(SUPPL. 1):319–24.
 94. Coura JR. Present situation and new strategies for chagas disease chemotherapy - A proposal. Vol. 104, *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009. p. 549–54.

95. Moraes CB, Franco CH. Novel drug discovery for Chagas disease. *Expert Opin Drug Discov.* 2016;441(March):1–9.
96. Chatelain E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. *J Biomol Screen.* 2014;20(1):22–35.
97. Brener Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* Infections. *Adv Pharmacol.* 1975;13(C):1–44.
98. Gallerano RH, Marr JJ, Sosa RR. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1990;43(2):159–66.
99. Coura JR. Perspectivas actuales del tratamiento específico de la enfermedad de Chagas. Vol. 51, *Bol Chil Parasitol. Programma de Parasitologia*; 1996. 69-73 p.
100. Urbina J a. Chemotherapy of Chagas' disease: the how and the why. *J Mol Med (Berl).* 1999;77(3):332–8.
101. Salomão K, De Castro SL. Recent advances in drug development for Chagas disease: two magic words, combination and repositioning. In: Santos ECT, editor. *Different Aspects on Chemotherapy of Trypanosomatids.* New York: Nova Science Publishers; 2017. p. 181–226.
102. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents.* 2003;21(1):27–38.
103. Molina J, Martins-Filho O, Brener Z, Romanha AJ, Loebenberg D, Urbina JA. Activities of the triazole derivative SCH 56592 (Posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44(1):150–5.
104. Wyllie S, Patterson S, Stojanovski L, Simeons FRC, Norval S, Kime R, et al. The anti-trypanosome drug fexinidazole shows potential for treating visceral leishmaniasis. *Sci Transl Med.* 2012;4(119).
105. Torreele E, Trunz BB, Tweats D, Kaiser M, Brun R, Mazué G, et al. Fexinidazole - a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(12):1–15.
106. Bahia MT, de Andrade IM, Martins TAF, do Nascimento ÁFDS, Diniz LDF, Caldas

- IS, et al. Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012 Jan;6(11):e1870.
107. DNDi. Fexinidazole (Chagas) – DNDi [Internet]. 2017 [cited 2018 Jan 16]. Available from: <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/fexinidazole-chagas/>
 108. Papadopoulou M V, Bloomer WD, Rosenzweig HS, Ashworth R, Wilkinson SR, Kaiser M, et al. Novel 3-nitro-1H-1,2,4-triazole-based compounds as potential anti-Chagasic drugs: in vivo studies. *Futur Med Chem*. 2013;5(15):1763–76.
 109. DNDi. Nitroimidazole (Chagas) – DNDi [Internet]. 2015 [cited 2018 Jan 16]. Available from: <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/nitroimidazole-chagas/>
 110. Thompson AM, O'Connor PD, Marshall AJ, Yardley V, Maes L, Gupta S, et al. 7-Substituted 2-Nitro-5,6-dihydroimidazo[2,1- b][1,3]oxazines: Novel Antitubercular Agents Lead to a New Preclinical Candidate for Visceral Leishmaniasis. *J Med Chem*. 2017;60(10):4212–33.
 111. Barr SC, Warner KL, Kornreic BG, Piscitelli J, Wolfe A, Benet L, et al. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Dec 1;49(12):5160–1.
 112. McKerrow JH, Doyle PS, Engel JC, Podust LM, Robertson SA, Ferreira R, et al. Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Jul;104(SUPPL. 1):263–9.
 113. Drugs for Neglected Diseases initiative - K777 (CHAGAS) [Internet]. 2014 [cited 2017 Jan 1]. Available from: <https://www.dndi.org/diseases-projects/portfolio/completed-projects/k777/>
 114. Ndao M, Beaulieu C, Black WC, Isabel E, Vasquez-Camargo F, Nath-Chowdhury M, et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a chagas disease cure. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):1167–78.
 115. Avelar LAA, Camilo CD, De Albuquerque S, Fernandes WB, Gonçalez C, Kenny PW, et al. Molecular design, synthesis and trypanocidal activity of dipeptidyl nitriles as cruzain inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(7):1–24.
 116. Burtoloso ACB, de Albuquerque S, Furber M, Gomes JC, Gonçalez C, Kenny PW, et al. Anti-trypanosomal activity of non-peptidic nitrile-based cysteine protease

- inhibitors. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(2).
117. Choy JW, Bryant C, Calvet CM, Doyle PS, Gunatilleke SS, Leung SSF, et al. Chemical-biological characterization of a cruzain inhibitor reveals a second target and a mammalian off-target. *Beilstein J Org Chem*. 2013;9:15–25.
 118. Caputto ME, Ciccarelli A, Frank F, Moglioni AG, Moltrasio GY, Vega D, et al. Synthesis and biological evaluation of some novel 1-indanone thiazolyhydrazone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents. *Eur J Med Chem*. 2012;55:155–63.
 119. Cragg GM, Grothaus PG, Newman DJ. New horizons for old drugs and drug leads. *J Nat Prod*. 2014;77(3):703–23.
 120. Kaiser M, Maes L, Tadoori LP, Spangenberg T, Ioset JR. Repurposing of the open access malaria box for kinetoplastid diseases identifies novel active scaffolds against trypanosomatids. *J Biomol Screen*. 2015;20(5):634–45.
 121. Field MC, Horn D, Fairlamb AH, Ferguson MAJ, Gray DW, Read KD, et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. *Nat Rev Microbiol*. 2017;(March).
 122. Planer JD, Hulverson MA, Arif JA, Ranade RM, Don R, Buckner FS. Synergy Testing of FDA-Approved Drugs Identifies Potent Drug Combinations against *Trypanosoma cruzi*. 2014;8(7).
 123. De Rycker M, Thomas J, Riley J, Brough SJ, Miles TJ, Gray DW. Identification of Trypanocidal Activity for Known Clinical Compounds Using a New *Trypanosoma cruzi* Hit-Discovery Screening Cascade. Burleigh BA, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Apr 15;10(4):e0004584.
 124. Alberca LN, Sbaraglini ML, Balcazar D, Fraccaroli L, Carrillo C, Medeiros A, et al. Discovery of novel polyamine analogs with anti-protozoal activity by computer guided drug repositioning. *J Comput Aided Mol Des*. 2016;30(4):305–21.
 125. Ekins S, Siqueira-neto JL De, McCall L, Sarker M, Yadav M, Ponder EL, et al. Machine Learning Models and Pathway Genome Data Base for *Trypanosoma cruzi* Drug Discovery. 2015;1–18.
 126. Morillo CA, Waskin H, Sosa-Estani S, del Carmen Bangher M, Cuneo C, Milesi R, et al. Benznidazole and Posaconazole in Eliminating Parasites in Asymptomatic *T. Cruzii* Carriers: The STOP-CHAGAS Trial. *J Am Coll Cardiol*.

- 2017;69(8):939–47.
127. Torrico F, Gascon J, Ortiz L, Alonso-Vega C, Pinazo M-J, Schijman A, et al. Treatment of adult chronic indeterminate Chagas disease with benznidazole and three E1224 dosing regimens: a proof-of-concept, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2018 Jan 15;0(0).
 128. ISGlobal. BENDITA - Project - ISGLOBAL [Internet]. 2018 [cited 2018 Jan 18]. Available from: https://www.isglobal.org/en/project/-/asset_publisher/6f6QOKuKkIC3/content/bendita
 129. Guedes-Da-Silva FH, Batista DGJ, Meuser MB, Demarque KC, Fulco TO, Araújo JS, et al. In vitro and in vivo trypanosomicidal action of novel arylimidamides against *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2425–34.
 130. Novaes RD, Sartini MVP, Rodrigues JPF, Gonçalves RV, Santos EC, Souza RLM, et al. Curcumin Enhances the Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Benznidazole-Based Chemotherapy in Acute Experimental Chagas Disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3355–64.
 131. García MC, Ponce NE, Sanmarco LM, Manzo RH, Jimenez-Kairuz AF, Aoki MP. Clomipramine and benznidazole act synergistically and ameliorate the outcome of experimental chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(6):3700–8.
 132. Cevey AC, Mirkin GA, Donato M, Rada MJ, Penas FN, Gelpi RJ, et al. Treatment with Fenofibrate plus a low dose of Benznidazole attenuates cardiac dysfunction in experimental Chagas disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2017;7(3):378–87.
 133. Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(7):507–19.
 134. Bleicher KH, Böhm H-J, Müller K, Alanine AI. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 May;2(5):369–78.
 135. Vincent F, Loria P, Pregel M, Stanton R, Kitching L, Nocka K, et al. Developing predictive assays: The phenotypic screening “rule of 3”. *Sci Transl Med*. 2015;7(293):293ps15.
 136. Gupta S, Garg NJ. Delivery of antigenic candidates by a DNA/MVA heterologous approach elicits effector CD8(+)T cell mediated immunity against *Trypanosoma cruzi*. *Vaccine*. 2012 Nov 26;30(50):7179–86.

137. Gilbert IH. Drug discovery for neglected diseases: Molecular target-based and phenotypic approaches. *J Med Chem*. 2013;56(20):7719–26.
138. Germain AR, Carmody LC, Dockendorff C, Galan-Rodriguez C, Rodriguez A, Johnston S, et al. Identification of small-molecule inhibitors of *Trypanosoma cruzi* replication. *Bioorganic Med Chem Lett*. 2011;21(23):7197–200.
139. Butera JA. Phenotypic screening as a strategic component of drug discovery programs targeting novel antiparasitic and antimycobacterial agents: An editorial. *J Med Chem*. 2013;56(20):7715–8.
140. Nohara LL, Lema C, Bader JO, Aguilera RJ, Almeida IC. High-content imaging for automated determination of host-cell infection rate by the intracellular parasite *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int*. 2010 Dec;59(4):565–70.
141. Chatelain E, Ioset J-R. Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2018 Feb 20;13(2):141–53.
142. Bustamante JM, Tarleton RL. Methodological advances in drug discovery for Chagas disease. *Expert Opin Drug Discov*. 2011;6(6):653–61.
143. Maeda FY, Clemente TM, Macedo S, Cortez C, Yoshida N. Host cell invasion and oral infection by *Trypanosoma cruzi* strains of genetic groups TcI and TcIV from chagasic patients. *Parasit Vectors*. 2016;9:189.
144. FRANCISCO AF, JAYAWARDHANA S, LEWIS MD, TAYLOR MC, KELLY JM. Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. *Parasitology*. 2017 Aug 23;1–10.
145. Duran-Rehbein GA, Vargas-Zambrano JC, Cuéllar A, Puerta CJ, Gonzalez JM. Mammalian cellular culture models of *Trypanosoma cruzi* infection: a review of the published literature. *Parasite*. 2014;21(c):38.
146. Schenkman S, Mortara RA. HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *J Cell Sci*. 1992;101 (Pt 4):895–905.
147. De Souza W, De Carvalho TMU, Barrias ES. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. *Int J Cell Biol*. 2010;2010.
148. Romanha AJ, Castro SL De, Soeiro MDNC, Lannes-Vieira J, Ribeiro I, Talvani A, et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development

- for Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Mar;105(2):233–8.
149. Engel JC, Ang KKH, Chen S, Arkin MR, McKerrow JH, Doyle PS. Image-based high-throughput drug screening targeting the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Aug;54(8):3326–34.
 150. DNDi. DNDi Chagas Fact Sheet. 2015.
 151. Buckner FS, Verlinde CLMJ, Flamme ACL a, Voorhis WCV a N. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against. *Microbiology*. 1996;40(11):2592–7.
 152. Bettiol E, Samanovic M, Murkin AS, Raper J, Buckner F, Rodriguez A. Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi* by chemical library screening. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(2).
 153. Peña I, Pilar Manzano M, Cantizani J, Kessler A, Alonso-Padilla J, Bardera AI, et al. New Compound Sets Identified from High Throughput Phenotypic Screening Against Three Kinetoplastid Parasites: An Open Resource. *Sci Rep*. 2015;5:8771.
 154. Canavaci AMC, Bustamante JM, Padilla AM, Brandan CMP, Simpson LJ, Xu D, et al. In Vitro and In Vivo High-throughput assays for the testing of Anti-trypanosoma cruzi compounds. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7).
 155. Moon S, Siqueira-Neto JL, Moraes CB, Yang G, Kang M, Freitas-Junior LH, et al. An image-based algorithm for precise and accurate high throughput assessment of drug activity against the human parasite *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 2014 Jan;9(2):e87188.
 156. Alonso-Padilla J, Cotillo I, Presa JL, Cantizani J, Peña I, Bardera AI, et al. Automated High-Content Assay for Compounds Selectively Toxic to *Trypanosoma cruzi* in a Myoblastic Cell Line. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):e0003493.
 157. Sykes ML, Avery VM. Development and application of a sensitive, phenotypic, high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2015;5(3):215–28.
 158. Neitz RJ, Chen S, Supek F, Yeh V, Kellar D, Gut J, et al. Lead Identification to Clinical Candidate Selection: Drugs for Chagas Disease. *J Biomol Screen*. 2014;20(1):101–11.
 159. Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*.

- 2002;8(4):269–85.
160. Parsons M, Furuya T, Pal S, Kessler P. Biogenesis and function of peroxisomes and glycosomes. Vol. 115, *Molecular and Biochemical Parasitology*. 2001. p. 19–28.
 161. Docampo R, Moreno SNJ. Acidocalcisomes. Vol. 50, *Cell Calcium*. 2011. p. 113–9.
 162. Menna-Barreto RFS, Salomão K, Dantas AP, Santa-Rita RM, Soares MJ, Barbosa HS, et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. *Micron*. 2009;40:157–68.
 163. Caradonna KL, Engel JC, Jacobi D, Lee CH, Burleigh BA. Host metabolism regulates intracellular growth of *trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe*. 2013;13(1):108–17.
 164. Sadok Menna-Barreto R, Belloze K, Perales J, Silva-Jr F. Proteomic and Bioinformatic Analysis of *Trypanosoma cruzi* Chemotherapy and Potential Drug Targets: New Pieces for an Old Puzzle. *Curr Drug Targets*. 2014;15(3):255–71.
 165. Barrett MP, Mottram JC, Coombs GH. Recent advances in identifying and validating drug targets in trypanosomes and leishmanias. Vol. 7, *Trends in Microbiology*. 1999. p. 82–8.
 166. Miller BR, Roitberg AE. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a drug target against Chagas disease (American trypanosomiasis). *Future Med Chem*. 2013;5(15):1889–900.
 167. Shang N, Li Q, Ko TP, Chan HC, Li J, Zheng Y, et al. Squalene Synthase As a Target for Chagas Disease Therapeutics. *PLoS Pathog*. 2014;10(5).
 168. Moretti NS, Augusto LDS, Clemente TM, Antunes RPP, Yoshida N, Torrecilhas AC, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* sirtuins as possible drug targets for Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4669–79.
 169. Gaspar L, Coron RP, KongThoo Lin P, Costa DM, Péres-Cabezas B, Tavares J, et al. Inhibitors of *Trypanosoma cruzi* Sir2 related protein 1 as potential drugs against Chagas disease. Almeida IC, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018 Jan 22;12(1):e0006180.
 170. Flohé L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. Vol. 30, *Biotechnology Advances*. 2012. p. 294–

- 301.
171. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Lira R, Romanha AJ. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2003 Jan;21(1):27–38.
 172. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) as a Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(16):2060–71.
 173. Bermudez J, Davies C, Simonazzi A, Pablo Real J, Palma S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. *Acta Trop*. 2016;156:1–16.
 174. Sueth-Santiago V, Franklim TN, Lopes ND, Lima MEF de. CYP51: Is it a Good Idea? *Rev Virtual Química*. 2015;7(2).
 175. Lepesheva GI, Zaitseva NG, Nes WD, Zhou W, Arase M, Liu J, et al. CYP51 from *Trypanosoma cruzi*: A phyla-specific residue in the B' helix defines substrate preferences of sterol 14 α -demethylase. *J Biol Chem*. 2006;281(6):3577–85.
 176. Lepesheva GI, Waterman MR. Sterol 14 α -demethylase cytochrome P450 (CYP51), a P450 in all biological kingdoms. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj*. 2007;1770(3):467–77.
 177. Lepesheva G, Park H-W, Hargrove T, Vanhollebeke B, Wawrzak Z, Harp J, et al. Crystal structures of *Trypanosoma brucei* sterol 14 α -demethylase and implications for selective treatment of human infections. *J Biol Chem*. 2010;285(3):1773–80.
 178. Cherkesova TS, Hargrove TY, Vanrell MC, Ges I, Usanov SA, Romano PS, et al. Sequence variation in CYP51A from the Y strain of *Trypanosoma cruzi* alters its sensitivity to inhibition. *FEBS Lett*. 2014;588(21):3878–85.
 179. Mercer EI. Sterol biosynthesis inhibitors: Their current status and modes of action. Vol. 26, *Lipids*. 1991. p. 584–97.
 180. Buckner FS, Urbina J a. Recent Developments in Sterol 14-demethylase Inhibitors for Chagas Disease. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*. 2012;2:236–42.
 181. Lepesheva GI, Ott RD, Hargrove TY, Kleshchenko YY, Schuster I, Nes WD, et al. Sterol 14 α -Demethylase as a Potential Target for Antitrypanosomal Therapy: Enzyme Inhibition and Parasite Cell Growth. *Chem Biol*. 2007;14(11):1283–93.

182. Rodrigues JCF, Rodriguez C, Urbina J a. Ultrastructural and Biochemical Alterations Induced by Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(2):487–99.
183. Lazardi K, Urbina JA, De Souza W. Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1990;34(11):2097–105.
184. Lazardi K, Urbina JA, De Souza W. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(4):736–40.
185. Vivas J, Urbina JA, De Souza W. Ultrastructural alterations in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* induced by ??(24(25)) sterol methyl transferase inhibitors and their combinations with ketoconazole. *Int J Antimicrob Agents*. 1997;8(1):1–6.
186. de Souza W, Rodrigues JCF. Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs. Vol. 2009, *Interdisciplinary perspectives on infectious diseases*. 2009. p. 642502.
187. Docampo R, Moreno SNJ, Turrens JF, Katzin AM, Gonzalez-Cappa SM, Stoppani AOM. Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1981;3(3):169–80.
188. França RRF, De Carvalho AS, Branco FSC, Pinto AC, Boechat N. Inibidores potentes da enzima esterol 14 α -desmetilase contra *Trypanosoma cruzi*. *Rev Virtual Quim*. 2014;6(5):1483–516.
189. McCabe RE, Remington JS, Araujo FG. Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. *J Infect Dis*. 1984;150(4):594–601.
190. McCabe R, McCabe R. Failure of ketoconazole to cure chronic murine chagas' disease. *J Infect Dis*. 1988;158(6):1408–9.
191. Campos R, Amato Neto V, Moreira AA, de Souza HB, Okumura M, Pinto PL, et al. [Evaluation of the therapeutic activity of fluconazole in acute experimental infection caused by *Trypanosoma cruzi*]. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*.

- 1992;47(4):174–5.
192. Buckner FS, Wilson AJ, White TC, Van Voorhis WC. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1998;42(12):3245–50.
 193. Moreira AAB, Souza HBWT de, Amato Neto V, Matsubara L, Pinto PLS, Tolezano JE, et al. Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1992 Apr;34(2):177–80.
 194. Buckner FS. Sterol 14-Demethylase Inhibitors for *Trypanosoma cruzi* Infections. In: *Drug Targets in Kinetoplastid Parasites*. New York, NY: Springer New York; 2008. p. 61–80.
 195. Gulin JEN, Eagleson M a, Postan M, Cutrullis R a, Freilij H, Bournissen FG, et al. Efficacy of voriconazole in a murine model of acute *Trypanosoma cruzi* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Apr;68(4):888–94.
 196. Molina I, Salvador F, Sá Nchez-Montalvaurpose AN. The use of posaconazole against Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis*. 2015;28(5):397–407.
 197. Urbina JA. Recent clinical trials for the etiological treatment of chronic chagas disease: Advances, challenges and perspectives. *J Eukaryot Microbiol*. 2015;62(1):149–56.
 198. Da Matta Guedes PM, Urbina JA, De Lana M, Afonso LCC, Veloso VM, Tafuri WL, et al. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in dog hosts. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(11):4286–92.
 199. Urbina JA, Payares G, Molina J, Sanoja C, Liendo A, Lazardi K, et al. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. *Science* (80-). 1996;273(5277):969–71.
 200. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, Molina J, Lira R, Brener Z, et al. Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug-resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21(1):39–48.
 201. Kraus JM, Verlinde CL, Karimi M, Lepesheva GI, Gelb MH, Buckner FS. Rational modification of a candidate cancer drug for use against Chagas {disease.[Erratum]

- appears in J Med Chem. 2009 Jul {23;52(14):4549}.[Erratum] appears in J Med Chem. 2009 Aug 13;52(15):4979]. J Med Chem. 2009;52(6):1639–47.
202. Guedes-Da-silva FH, Batista DGJ, Da Silva CF, De Araújo JS, Pavão BP, Simões-Silva MR, et al. Antitrypanosomal activity of sterol 14 α -demethylase (CYP51) inhibitors VNI and VFV in the swiss mouse models of chagas disease induced by the *Trypanosoma cruzi* Y strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4):1–9.
 203. Lepesheva GI. Design or screening of drugs for the treatment of Chagas disease: what shows the most promise? *Expert Opin Drug Discov*. 2013;29(6):997–1003.
 204. Hargrove TY, Wawrzak Z, Alexander PW, Chaplin JH, Keenan M, Charman SA, et al. Complexes of *trypanosoma cruzi* Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) with Two Pyridine-based Drug Candidates for Chagas Disease: Structural basis for pathogen selectivity. *J Biol Chem*. 2013;288(44):31602–15.
 205. Torrico F. E1224—Results of proof of concept clinical trial in patients with chronic indeterminate Chagas disease In: *Proceedings of the 62nd Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene*. Washington, DC; 2013.
 206. Moraes CB, Giardini M a, Kim H, Franco CH, Araujo-Junior AM, Schenkman S, et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep*. 2014 Jan;4:4703.
 207. Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, Taylor MC, Kelly JM, Chatelain E, et al. Limited Ability of Posaconazole To Cure both Acute and Chronic *Trypanosoma cruzi* Infections Revealed by Highly Sensitive In Vivo Imaging. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4653–61.
 208. Khare S, Liu X, Stinson M, Rivera I, Groessl T, Tuntland T, et al. Antitrypanosomal treatment with benznidazole is superior to posaconazole regimens in mouse models of Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6385–94.
 209. Nozaki T, Engel JC, Dvorak JA. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*. 1996;55(1):111–7.
 210. Campos MCO, Leon LL, Taylor MC, Kelly JM. Benznidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi*: Evidence that distinct mechanisms can act in concert. *Mol*

- Biochem Parasitol. 2014;193(1):17–9.
211. Nogueira FB, Krieger MA, Nirdé P, Goldenberg S, Romanha AJ, Murta SMF. Increased expression of iron-containing superoxide dismutase-A (TcFeSOD-A) enzyme in *Trypanosoma cruzi* population with in vitro-induced resistance to benznidazole. *Acta Trop*. 2006 Nov;100(1–2):119–32.
 212. Nogueira FB, Ruiz JC, Robello C, Romanha AJ, Murta SMF. Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole. *Parasitol Res*. 2009;104(4):835–44.
 213. Mejia AM, Hall BS, Taylor MC, Gómez-Palacio A, Wilkinson SR, Triana-Chávez O, et al. Benznidazole-resistance in *trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. *J Infect Dis*. 2012;206(2):220–8.
 214. Trochine A, Alvarez G, Corre S, Faral-Tello P, Durán R, Batthyany CI, et al. *Trypanosoma cruzi* chemical proteomics using immobilized benznidazole. *Exp Parasitol*. 2014 May;140:33–8.
 215. Zingales B, Araujo RGA, Moreno M, Franco J, Aguiar PHN, Nunes SL, et al. A novel ABCG-like transporter of *Trypanosoma cruzi* is involved in natural resistance to benznidazole. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):433–44.
 216. García-Huertas P, Mejía-Jaramillo AM, Machado CR, Guimarães AC, Triana-Chávez O. Prostaglandin F₂α synthase in *trypanosoma cruzi* plays critical roles in oxidative stress and susceptibility to benznidazole. *R Soc Open Sci*. 2017 Sep 20;4(9):170773.
 217. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1987 Jan;81(5):755–9.
 218. Neal RA, van Bueren J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1988 Jan;82(5):709–14.
 219. Camandaroba ELP, Reis EAG, Gonçalves MS, Reis MG, Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: Susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop*.

- 2003;36(2):201–9.
220. Avila JL, Avila A, Munoz E. Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30(4):769–74.
 221. Campos MC, Phelan J, Francisco AF, Taylor MC, Lewis MD, Pain A, et al. Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. *Sci Rep.* 2017;7(1).
 222. Zingales B, Miles M a, Moraes CB, Luquetti A, Guhl F, Schijman AG, et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2014 Sep;109(6):828–33.
 223. ATCC. ATCC medium: 1029 LIT medium [Internet]. *Biotechniques.* p. 1. Available from:
<https://www.atcc.org/~media/A3C1C35EC052430E858006C6E92ECFFD.ashx>
 224. Zhang J-H. A Simple Statistical Parameter for Use in Evaluation and Validation of High Throughput Screening Assays. *J Biomol Screen.* 1999;4(2):67–73.
 225. Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(1):1–1.
 226. Musa M, Kannan TP, Mustafa S. Cell Proliferation Study of Human Osteosarcoma Cell Line (U2OS) using Alamar Blue Assay and Live Cell Imaging. *IOSR J Dent Med Sci.* 2013;8(2):2279–861.
 227. Barbhaiya RH. From patient needs to implementation of new treatments Discovery and Lead Optimisation Programs: A Future Generation of Drugs for Neglected Diseases.
 228. Li XW, Herrmann J, Zang Y, Grellier P, Prado S, Müller R, et al. Synthesis and biological activities of the respirator chain inhibitor aurachin D and new ring versus chain analogues. *Beilstein J Org Chem.* 2013;9:1551–8.
 229. Harborne JB (Jeffrey B, Baxter H, Moss GP. *Phytochemical dictionary : a handbook of bioactive compounds from plants.* Taylor & Francis; 1999. 976 p.
 230. Höfle G, Böhlendorf B, Fecker T, Sasse F, Kunze B. Semisynthesis and antiplasmodial activity of the quinoline alkaloid aurachin E. *J Nat Prod.* 2008;71(11):1967–9.
 231. Meunier B, Madgwick SA, Reil E, Oettmeier W, Rich PR. New inhibitors of the quinol

- oxidation sites of bacterial cytochromes bo and bd. *Biochemistry*. 1995 Jan;34(3):1076–83.
232. Lu P, Heineke MH, Koul A, Andries K, Cook GM, Lill H, et al. The cytochrome bd-type quinol oxidase is important for survival of *Mycobacterium smegmatis* under peroxide and antibiotic-induced stress. *Sci Rep*. 2015;5.
233. Menzies SK, Tulloch LB, Florence GJ, Smith TK. The trypanosome alternative oxidase: a potential drug target? *Parasitology*. 2016;1–9.
234. Rovera G, Santoli D, Damsky C. Human promyelocytic leukemia cells in culture differentiate into macrophage-like cells when treated with a phorbol diester. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979;76(6):2779–83.
235. Nahapetian A T, Thomas JN, Thilly WG. Optimization of environment for high density Vero cell culture: effect of dissolved oxygen and nutrient supply on cell growth and changes in metabolites. *J Cell Sci*. 1986;81:65–103.
236. Bray M-A, Carpenter A. *Advanced Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening and Analysis*. 2012. p. 1–33.
237. Moreno M, D'ávila DA, Silva MN, Galvão LM, MacEdo AM, Chiari E, et al. *Trypanosoma cruzi* benzimidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010;105(7):918–24.
238. Sies H (Helmut), Packer L. *Protein sensors and reactive oxygen species. Part A, Selenoproteins and thioredoxin*. Academic Press; 2002. 511 p.
239. Kell DB, Dobson PD, Bilisland E, Oliver SG. The promiscuous binding of pharmaceutical drugs and their transporter-mediated uptake into cells: What we (need to) know and how we can do so. Vol. 18, *Drug Discovery Today*. 2013. p. 218–39.
240. Adeyemi OS, Molina MT, Eseola AO, Fonseca-Berzal C, Gomez-Barrio A. New imidazole-based compounds active against *Trypanosoma cruzi*. *Comb Chem High Throughput Screen*. 2017;
241. Woodring JL, Patel G, Erath J, Behera R, Lee PJ, Leed SE, et al. Evaluation of aromatic 6-substituted thienopyrimidines as scaffolds against parasites that cause

- trypanosomiasis, leishmaniasis, and malaria. *Med Chem Commun.* 2015;6(2):339–46.
242. Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, Martins SC, Ribeiro FM, Ud Din Z, Rodrigues-Filho E, et al. Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the *Trypanosoma cruzi* redox system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(2):890–903.
243. Campo VA. Comparative effects of histone deacetylases inhibitors and resveratrol on *Trypanosoma cruzi* replication, differentiation, infectivity and gene expression. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2017;7(1):23–33.
244. Benaim G, Hernandez-Rodriguez V, Mujica-Gonzalez S, Plaza-Rojas L, Silva ML, Parra-Gimenez N, et al. In vitro anti-*Trypanosoma cruzi* activity of dronedarone, a novel amiodarone derivative with an improved safety profile. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(7):3720–5.
245. Bot C, Hall BS, Bashir N, Taylor MC, Helsby N a., Wilkinson SR. Trypanocidal activity of aziridinyll nitrobenzamide prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010;54(10):4246–52.
246. Reimão JQ, Mesquita JT, Ferreira DD, Tempone AG. Investigation of Calcium Channel Blockers as Antiprotozoal Agents and Their Interference in the Metabolism of *Leishmania (L.) infantum*. *Evidence-based Complement Altern Med.* 2016;2016.
247. Salehi AH, Morris SJ, Ho WC, Dickson KM, Doucet G, Milutinovic S, et al. AEG3482 is an antiapoptotic compound that inhibits Jun kinase activity and cell death through induced expression of heat shock protein 70. *Chem Biol.* 2006;13(2):213–23.
248. Kunze DL, Rampe D. Characterization of the effects of a new Ca²⁺ channel activator, FPL 64176, in GH3 cells. *MolPharmacol.* 1992;42(0026–895X (Print)):666–70.
249. Benaim G, Garcia CRS. Targeting calcium homeostasis as the therapy of Chagas' disease and leishmaniasis - a review. *Trop Biomed.* 2011;28(3):471–81.
250. Benaim G, Sanders JM, Garcia-Marchán Y, Colina C, Lira R, Caldera AR, et al. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. *J Med Chem.* 2006;49(3):892–9.
251. Lisboa S, Funda C, Cruz O. Recent advances in drug development for chagas

- disease : Two magic words , combination and repositioning. In: Different Aspects on Chemotherapy of Trypanosomatids. New York: Nova Science Publishers; 2017. p. 181–226.
252. Brenière SF, Waleckx E, Barnabé C. Over Six Thousand *Trypanosoma cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(8).
 253. Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de vries PJ. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(11):2576–97.
 254. Saraiva VB, Gibaldi D, Previato JO, Mendonça-Previato L, Bozza MT, Freire-de-Lima CG, et al. Proinflammatory and cytotoxic effects of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against drug-resistant strains of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(11):3472–7.
 255. Mani S, Muthusamy R, N B, S Y, K J, Kandasamy K. Clinical, Hematological Changes and Therapeutic Efficacy of Buparvaquone with Oxytetracycline against the Natural Infection of *Theileria Annulata* in Cattle. *Int J Livest Res*. 2017;1.
 256. Reimão JQ. Estudo da atividade anti-Leishmania e anti-*Trypanosoma cruzi* de bloqueadores de canal de cálcio, fuazolidona e buparvaquona: reposicionamento, associação de fármacos e formulações lipossomais. Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo; 2012.
 257. Patrick DA, Wenzler T, Yang S, Weiser PT, Wang MZ, Brun R, et al. Synthesis of novel amide and urea derivatives of thiazol-2-ethylamines and their activity against *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Bioorganic Med Chem*. 2016;24(11):2451–65.
 258. Sykes ML, Baell JB, Kaiser M, Chatelain E, Moawad SR, Ganame D, et al. Identification of Compounds with Anti-Proliferative Activity against *Trypanosoma brucei brucei* Strain 427 by a Whole Cell Viability Based HTS Campaign. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11).
 259. Duffy S, Sykes ML, Jones AJ, Shelper TB, Simpson M, Lang R, et al. Screening the MMV Pathogen Box across multiple pathogens reclassifies starting points for open source drug discovery. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;AAC.00379-17.
 260. Martínez-Díaz RA, Escario JA, Nogal-Ruiz JJ, Gómez-Barrio A. Biological

- Characterization of *Trypanosoma cruzi* Strains. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(1):53–9.
261. Prasad R, Ghannoum MA. *Lipids of Pathogenic Fungii*. Baker M, editor. Boca Raton: CRC Press; 1996.
262. Sekiya T, Nozawa Y. Reorganization of membrane ergosterol during cell fission events of *Candida albicans*: A freeze-fracture study of distribution of filipin-ergosterol complexes. *J Ultrastructure Res*. 1983;83(1):48–57.
263. Schrick K, Mayer U, Horrichs A, Kuhnt C, Bellini C, Dangl J, et al. FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev*. 2000;14(12):1471–84.
264. Keenan M, Chaplin JH, Alexander PW, Abbott MJ, Best WM, Khong A, et al. Two analogues of fenarimol show curative activity in an experimental model of Chagas disease. *J Med Chem*. 2013;56(24):10158–70.
265. De-Castro S, Soeiro M, Higashi K, Meirelles M. Differential effect of amphotericin B on the three evolutive stages of *Trypanosoma cruzi* and on the host cell-parasite interaction. *Brazilian J Med Biol Res*. 1993;26(11):1219–29.
266. Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with Ambisome. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(6).
267. Haido RM, Barreto-Bergter E. Amphotericin B-induced damage of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Chem Biol Interact*. 1989;71(1):91–103.
268. Borsari C, Santarem N, Torrado J, Olías AI, Corral MJ, Baptista C, et al. Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds. *Eur J Med Chem*. 2017;126:1129–35.
269. Linciano P, Moraes CB, Alcantara LM, Franco CH, Pascoalino B, Freitas-Junior LH, et al. Aryl thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections. *Eur J Med Chem*. 2018 Jan;
270. Bosc D, Mouray E, Cojean S, Franco CH, Loiseau PM, Freitas-Junior LH, et al. Highly improved antiparasitic activity after introduction of an N -benzylimidazole moiety on protein farnesyltransferase inhibitors. *Eur J Med Chem*. 2016;109(May 2016):173–86.

271. Souza BF De, Roncaglia M, Souza RP De, Cämmerer B, Aimée N, Franco CH, et al. Synthesis of Chiral 3-[[Aryl] methyl] amino]- and 3-[[Heteroaryl]-methyl]-amino]-quinuclidines with High Biological Activity against Intracellular Trypanosoma cruzi Amastigotes. *Int J Chem Pharm Sci.* 2016;4(5):270–6.
272. Souza GF, Cämmerer SB, Franco CH, Alcantara LM, Moraes CB, Freitas-Junior LH. N-[4-[Benzyloxy] benzyl]-benzenemethanamines with High Biological Activity against Intracellular Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum Amastigotes. *Int J Chem Pharm Sci.* 2016;4(11):575–83.
273. Silva FT. Antichagásicos potenciais: planejamento e síntese de bioisómeros 1,2,4-triazólicos do hidroximetilnitrofural e análogos. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2014.
274. Silva FT, Franco CH, Favaro DC, Freitas-Junior LH, Moraes CB, Ferreira EI. Design, synthesis and antitrypanosomal activity of some nitrofurazone 1,2,4-triazolic bioisosteric analogues. *Eur J Med Chem.* 2016;121:553–60.
275. Balfour MN, Franco CH, Moraes CB, Freitas-Junior LH, Stefani HA. Synthesis and trypanocidal activity of a library of 4-substituted 2-(1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2-yl)propan-2-ols. *Eur J Med Chem.* 2017;128:202–12.
276. Silva DG, Ribeiro JFR, De Vita D, Cianni L, Franco CH, Freitas-Junior LH, et al. A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors. *Bioorganic Med Chem Lett.* 2017;27(22):5031–5.
277. Palace-Berl F. Planejamento de fármacos anti-T. cruzi: Síntese de compostos nitrofurânicos, avaliação da atividade biológica in vitro e estudos de relações estrutura-atividade. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2016.
278. Palace-Berl F, Pasqualoto KFM, Zingales B, Moraes CB, Bury M, Franco CH, et al. Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofurán-2-yl) methylene] substituted hydrazides against Trypanosoma cruzi to design novel active compounds. *Eur J Med Chem.* 2018 Jan 20;144:29–40.
279. Silva TR, Duarte AWF, Passarini MRZ, Ruiz ALTG, Franco CH, Moraes CB, et al. Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities. *Polar Biol.* 2018;

280. Machado FC, Franco CH, dos Santos Neto JV, Dias-Teixeira KL, Moraes CB, Lopes UG, et al. Identification of di-substituted ureas that prevent growth of trypanosomes through inhibition of translation initiation. *Sci Rep.* 2018 Dec 20;8(1):4857.

7. ANEXOS

Os principais resultados obtidos nesta tese foram escritos em forma de manuscrito e serão submetidos para publicação em breve; os **anexos I e II** representam os manuscritos referentes às partes II e III desta tese, respectivamente. Além dos resultados principais aqui reportados e discutidos, o ensaio desenvolvido neste trabalho foi utilizado para triagem de compostos e estudos biológicos relacionados a projetos em colaboração.

O ensaio fenotípico padronizado por nós foi usado num projeto associado ao consórcio internacional *New Medicines for Trypanosomatidic Infections* (NMTrypI, <http://fp7-nmtrypi.eu>), que integra centros de pesquisa, universidades e pequenas empresas de nove países e foi fomentado pela Comissão Europeia. Durante o curso do projeto, foi triada uma extensa biblioteca contendo 10.000 amostras de extratos de fungos e frações cromatográficas parcialmente purificadas (biblioteca MycoDiverse™ – HYPHA, Reino Unido), juntamente com cerca de 200 extratos de plantas medicinais africanas (biblioteca NCR, Sudão) e pequenas bibliotecas de compostos sintéticos. As amostras de produto natural ativas foram sub-fracionadas e reenviadas para o teste em soluções cada vez mais puras. As bibliotecas também têm sido testadas por nosso grupo contra *L. infantum* e *T. brucei brucei*; o objetivo é continuar testando as sub-frações sucessivas dos extratos contra os tripanosomatídeos até a obtenção de um produto purificado inédito com atividade antiparasitária. Algumas amostras da extratoteca apresentaram atividades promissoras nas triagens primárias contra *T. cruzi*, entretanto houve uma perda significativa de seletividade quando as frações derivadas foram testadas. Dentre os compostos sintéticos, destacaram-se as chalconas metoxiladas que apresentaram atividade satisfatória contra *T. cruzi*, *T. brucei* e *L. infantum*, além de não apresentarem toxicidade significativa contra células humanas (268) – **anexo IV** -. Outra classe de compostos que também foi explorada da porção sintética desta triagem foi a das aril tiossemicarbazonas, cujos compostos atingiram potência na ordem sub-micromolar contra as três espécies de tripanossomatídeos, sem efeitos citotóxicos em células humanas (269) – **anexo V** -.

Em relação às bibliotecas menores de colaboradores, estas foram triadas seguindo o protocolo 2, inclusive com intuito de validar a reprodutibilidade e robustez deste ensaio, já que as amostras foram testadas pelo menos em duplicata. Foram triadas, mais de 1.000 amostras de 20 instituições distintas, entre extratos de plantas, fungos, bactérias a compostos sintéticos obtidos a partir de *design* racional. Das amostras testadas, diversos compostos sintéticos apresentaram atividades proeminentes contra *T. cruzi*, os principais resultados (publicados até então) estão resumidamente descritos a seguir.

Uma série de inibidores da proteína farnesil-transferase com grupamento N-benzilimidazol foi testada em nosso ensaio de alto conteúdo; quatro moléculas foram ativas, não só contra *T. cruzi*, mas também outros parasitas, como *L. donovani*, *T. brucei* e *P. falciparum* (Bosc, 2016) – **anexo VI** -.

Uma pequena biblioteca de arilquinuclidinas quirais foi triada contra os amastigotas intracelulares de *T. cruzi* e foi traçada uma relação de estrutura-atividade com ênfase na quiralidade dos compostos testados (De Souza et al.a 2016) – **anexo VII** -; deste mesmo grupo com expertise em síntese química, foram enviados compostos bioesósteros de benzilfarnesilamina com potencial inibição de esqualeno sintase; os sete compostos foram testados contra *T. cruzi* e *L. infantum* e apresentaram inibição satisfatória das formas intracelulares destes parasitas (272) – **anexo VIII** -.

Quatro análogos de nitrofurazona foram sintetizados racionalmente com intuito de agir sob diferentes vias: inibição da TcCYP51, via da cruzaina e através de liberação de espécies reativas de oxigênio; os compostos foram testados contra *T. cruzi* e eliminaram a infecção em células U2OS (273,274) – **anexo IX** -.

Uma pequena biblioteca contendo 17 compostos 2-(1H-pirrolo[3,2-c]piridina-2-il)propan-2-óis derivados de azaindóis tiveram a atividade tripanocida avaliada; três compostos exibiram atividade relativamente alta contra *T. cruzi*, no entanto também foram tóxicos para a célula hospedeira testada (275) – **anexo X** -.

Inibidores de cruzaina foram desenvolvidos empregando grupos alternativos como warheads no lugar dos clássicos grupos nitrila, algumas dessas substituições geraram compostos com maior potencial de inibição da enzima cruzaina e também mais

ativos contra amastigotas intracelulares, com seletividade satisfatória em relação a célula hospedeira (276) – **anexo XI** -.

Quinze compostos derivados de nitrofurano foram racionalmente sintetizados e testados contra amastigotas de *T. cruzi* após seleção *in silico* por modelagem molecular e pré-triagem em formas epimastigotas; dois dos compostos mais ativos contra o parasita foram pelo menos 70 vezes mais potentes que o BZL e apresentaram um índice de seletividade superior a 200 (277,278) – **anexo XII**. Em colaboração com pesquisadores do ecossistema da Antártica, 326 bactérias extremófilas foram isoladas e identificadas em 39 gêneros distintos. O extrato de uma destas bactérias psicrotolerantes (isolado 99 - *Pseudomonas* sp.) apresentou atividade anti-*T. cruzi*, além de atividade antiproliferativa sobre linhagens tumorais humanas e outras cepas de bactérias (279) – **anexo XIII**.

Vinte e cinco análogos de 1,3-diaril-uréias e 1-((1,4-trans)-4-ariloxiciclohexil)-3-aril-uréias foram testados para avaliar possível inibição da multiplicação de *T. cruzi* por meio da fosforilação da subunidade alfa da eIF2; um dos compostos (I-17) apresentou atividade contra as fases de inseto e de mamífero com alta potência e seletividade. O composto também foi capaz de inibir a replicação de *T. brucei* (280) – **anexo XIV** .

Diversos outros compostos foram testados no ensaio de alto conteúdo contra *T. cruzi*; os resultados estão sendo atualmente submetidos em periódicos ou em vias de submissão, apresentadas em congressos nacionais e internacionais, além de contribuírem para dissertações, teses e projetos de *post-doc*.

Anexo I:

Caio Haddad Franco, Laura Maria Alcântara, Eric Chatelain, Lucio Freitas-Junior and Carolina Borsoi Moraes. **High content screening of pharmacologically active compounds against *Trypanosoma cruzi*: impact of different host cell lineages in hit selection and novel candidates for Chagas disease**

Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação em revista indexada.

Abstract

High content screening (HCS) technology enables the triage of a large quantity of molecules within a relatively short period in an efficient and robust fashion. Because *Trypanosoma cruzi* is promiscuous with regards to host cell infection, virtually any mammalian cell can be used for in vitro anti-*T. cruzi* phenotypic screening assays. However, cellular dynamics and host-parasite interactions may play important role when assessing the potential anti-chagasic effect of compounds. To verify this hypothesis, we have screened a pharmacologically active molecule library of 1,280 compounds, at 10 μ M, using four distinct cell lineages infected with *T. cruzi* Y strain: human U2OS, human THP-1, monkey VERO and rat L6 cell lines. Depending on the host cell used, different phenotypic readouts were observed following parasite infection for 120 h: the average infection ratio observed for L6 cells was about 2.5-fold that detected for VERO cells; likewise, the average number of amastigotes per infected cell was nearly 10-fold higher in L6 cells when compared to VERO cells; values of infection ratio and average amastigotes per infected cell detected in THP-1 were also relatively high (76% and 13, respectively), while intermediate records were obtained for U2OS (52% and 5, respectively). Primary screening results yielded 82 compounds whose activity were superior to 50% inhibition and with toxicity to host cell lower than 50%. From these compounds, only two hits were common to all four cell lineages (2.4%), nine were shared by three cell lineages (11%), 20 compounds were common for two cell lineages (24.4%) and 51 were exclusively selected from a single cell lineage (62.2%). Infected U2OS cell lineage was the most sensitive hit-generation system, as 27 exclusive compounds were identified when using this cell line as host cell; conversely, THP-1 and L6 infected cell lineages had the lowest hit rates, generating six and five exclusive hit compounds, respectively. Confirmatory dose-response assays were performed against three *T. cruzi* strains (Y, CL Brener and Silvio X10/1) infecting U2OS host cells; compounds CB1954, FPL64176, AEG3482 and entecavir presented EC50 values lower than 10 μ M and CC50 higher than 100 μ M for at least two *T. cruzi* strains. Combinatory tests between entecavir and FPL64176 with reference drugs benznidazole and posaconazole revealed that additive interactions occurred among them, no antagonistic effects were observed. These compounds could be repurposed or serve as starting molecules for the development of novel anti-chagasic drugs.

Anexo II:

Caio Haddad Franco, Tapan Bhattacharyya, Alan Au, David Warhust, Miriam Giardini, Bruno Pascoalino, Lucio Freitas-Junior, Eric Chatelain, Michael Miles and Carolina Borsoi Moraes. **Novel structural CYP51 mutation in *Trypanosoma cruzi* with elevated resistance to ravuconazole *in vitro* and cross-resistance to CYP51 inhibitors**

Manuscrito em preparação a ser submetido para publicação em revista indexada.

Abstract

In order to study triazole resistance in *Trypanosoma cruzi*, a clone of the Y strain was cultured under increasing on/off concentrations of ravuconazole, until *in vitro* stability was achieved at 500 nM of this drug. The resistant clone exhibited a relatively low infection ratio and a reduced number of intracellular amastigotes, when compared to the wild-type clone; it also presented a slowed epimastigogenesis process and decelerated growth in this stage; the differentiation into epimastigotes did not occur in the presence of ravuconazole. In drug activity assays, ravuconazole was at least 1,000-fold less potent to resistant clone, when compared to the wild-type. The Resistance was maintained even after several weeks off of ravuconazole and also after passing the parasite through the complete *in vitro* life cycle. A novel mutation was detected close to an enzyme active site that appears to have potentially biochemical relevant effects on the efficiency of CYP51 inhibitor drugs. Since the mutation is associated with a decrease in the therapeutic efficiency of ravuconazole, we assume it restricts the access of the drug to the 6th coordination site of the iron in the spatially restricted area of the active site. We have also discovered cross-resistance to other azole compounds (posaconazole, fluconazole, ketoconazole, voriconazole and litraconazole) and to non-azole CYP51 inhibitors (UDD and UDO) but not to standard anti-*T. cruzi* drugs that act independently of CYP51, such as benznidazole and nifurtimox.

Anexo III:

Carolina Borsoi Moraes and Caio Haddad Franco, Novel drug discovery for Chagas disease. Expert Opinion on Drug Discovery, 2016

EXPERT OPINION ON DRUG DISCOVERY, 2016
<http://dx.doi.org/10.1517/17460441.2016.1160883>



REVIEW

Novel drug discovery for Chagas disease

Carolina B. Moraes ^a and Caio H. Franco ^{a,b}

^aLaboratório Nacional de Biotecnologias (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, Brazil; ^bGraduate Program in Microbiology and Immunology, Universidade Federal de Sao Paulo, Sao Paulo, Brazil

ABSTRACT

Introduction: Chagas disease is a chronic infection associated with long-term morbidity. Increased funding and advocacy for drug discovery for neglected diseases have prompted the introduction of several important technological advances, and Chagas disease is among the neglected conditions that has mostly benefited from technological developments. A number of screening campaigns, and the development of new and improved *in vitro* and *in vivo* assays, has led to advances in the field of drug discovery.

Areas covered: This review highlights the major advances in Chagas disease drug screening, and how these are being used not only to discover novel chemical entities and drug candidates, but also increase our knowledge about the disease and the parasite. Different methodologies used for compound screening and prioritization are discussed, as well as novel techniques for the investigation of these targets. The molecular mechanism of action is also discussed.

Expert opinion: Technological advances have been executed with scientific rigour for the development of new *in vitro* cell-based assays and *in vivo* animal models, to bring about novel and better drugs for Chagas disease, as well as to increase our understanding of what are the necessary properties for a compound to be successful in the clinic. The gained knowledge, combined with new exciting approaches toward target deconvolution, will help identifying new targets for Chagas disease chemotherapy in the future.

ARTICLE HISTORY

Received 23 August 2015
Accepted 29 February 2016
Published online
30 March 2016

KEYWORDS

Trypanosoma cruzi; Chagas disease drug discovery; high content screening; target deconvolution

1. Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a neglected tropical disease caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. It is estimated that over six million people are infected with *T. cruzi* worldwide,[1] and despite being endemic in 21 Latin American countries, recent increase in the incidence (or recognition) of Chagas disease has been reported in non-endemic, developed countries due to trends of intercontinental migration of infected individuals originating from Latin America.[2] The disease is transmitted by the hematophagous triatomine bug, primarily during blood meals, when the vector feeds on the host and secretes parasite-containing feces. This excreted infectious material is then mechanically introduced into the wound when the host scratches the itching bite site. Occasionally, humans are also infected through ingestion of food or drink contaminated with *T. cruzi*-infected triatomine bugs.[3] *T. cruzi* can also be transmitted by non-vectorial routes, such as blood transfusion, solid organs transplantation, or congenitally.[4–6]

The complex life cycle of *T. cruzi* involves both vertebrate (humans and other mammals) and invertebrate (the triatomine vector) hosts and can be separated into three distinct morphological stages: two replicative stages, the flagellated epimastigotes, found in the triatomine vector, and the round amastigotes, which grow and multiply inside mammalian host cells. Both replicative stages can originate the non-replicative yet infective flagellated form, the trypomastigote. The latter is transmitted by the triatomine vector and is responsible for

invading mammalian cells and perpetuating the infection in mammals. *T. cruzi* is a genetically highly diverse and heterogeneous species, and it is currently categorized into six genetic lineages or groups, also known as discrete typing units (DTUs): TcI–TcVI.[7] Despite *T. cruzi* from these groups differing in geographic distribution, preference for wild or domestic hosts (including humans), and evidence of correlation between certain forms of Chagas disease and some DTUs, it is important to note that all *T. cruzi* are all capable of infecting humans and causing disease.[8–11]

If properly treated during acute phase, the development of Chagas disease into a chronic infection can be prevented. Without treatment, recent and usually mild acute *T. cruzi* infections spontaneously subside in the majority of patients into a clinical manifestation known as indeterminate form of Chagas disease.[12] Some patients, however, develop complications, such as the progressive cardiomyopathic clinical condition, or the digestive form of Chagas disease, characterized by enlargement of the esophagus and the colon (megaesophagus and megacolon syndromes); other patients present both the cardiac and digestive forms of Chagas disease.[13] Moreover, immunosuppressed individuals can face reactivation of naturally controlled *T. cruzi* infection, a problem that is not always easily managed.[14]

With no effective vaccine available, there are actual limited drug options for Chagas disease chemotherapy. Nifurtimox and benznidazole were empirically introduced into the clinical therapy over four decades ago, and remain as the only line of

CONTACT Carolina B. Moraes carolina.borsoi@lnbio.cnpem.br

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

Article highlights

- Chagas disease is a neglected tropical disease with limited funding for drug discovery and development and for which only old and unsafe drugs exist. Despite years of intensive research, there are very few validated molecular targets, making viability-based assays the major screening strategy available.
- High content screening has helped to increase the number of hits and leads issued from Chagas disease drug discovery; it offers advantages, such as higher sensitivity and improved translation to *in vivo* models.
- Screening campaigns for Chagas disease have resulted in the selection of a large proportion of CYP51 inhibitors, however recent clinical studies have shown these inhibitors to have unsustainable efficacy in patients.
- Secondary assays are important in the profiling of antichagasic compounds for determining the killing kinetics and spectrum of activity against *T. cruzi* strains, and increase data translation to *in vivo* models.
- New technologies for target deconvolution and identification of compounds emerging from phenotypic screens can aid in the understanding of a compound mechanism of action and lead to the discovery of new drug targets in *Trypanosoma cruzi*.

This box summarizes key points contained in the article.

chemotherapy to date. Both drugs can cure Chagas disease when administered during the acute phase, however the chronic phase cure rates seem to vary according to compounds dosage, treatment period, and patient region of origin.[15–19] Moreover, these drugs present significant limitations, such as poor tolerability, frequent and severe toxic effects arising during the lengthy treatment and, as consequence, low patient adherence and compliance to the treatment, as well as important contraindications.[19,20]

Considering all disadvantages of the current antichagasic chemotherapy, alternative drugs with a safer, more tolerable, and efficacious profile in the chronic phases remain a critical need.

2. Overview of methodologies applied in drug screening against *T. cruzi*

Traditionally, drug discovery for Chagas disease relied heavily on activities carried out in academic laboratories, with a few limited screens generating scarce number of anti-*T. cruzi* compounds. Most *in vitro* studies were based on evaluation of compound activity through manual annotation of individual infected cells and/or number of intracellular parasites. Although suitable for compound testing in small scales, this monotonous approach cannot be applied to the screening of large compound libraries, due to being laborious, time-consuming, potentially biased, and/or prone to error. Alternatively, screens have been performed against the insect-dwelling, axenic epimastigote forms, which are relatively simpler to work with, but are absent from humans and thus not considered the most relevant *T. cruzi* life cycle stage in terms of drug screening.[21] Starting in the late 1990s, the development of colorimetric- and fluorescence-based viability assays that utilize genetically engineered *T. cruzi* infecting tissue cultures was a welcome advance in the field that allowed increased throughput in compound screening for

Chagas disease. Of particular importance is the assay developed by Buckner and collaborators, which utilizes a clone of the *T. cruzi* Tulahuen strain genetically modified to express beta-galactosidase.[22] This widely used assay is accessible because the parasite line is readily available, and it has a simple and fast readout, requiring only common equipment as an absorbance/fluorescence microplate reader. Other similar assays have been developed using distinct reporter genes, such as firefly luciferase [23] and tandem tomato fluorescent protein.[24] Concomitantly, substantial advances in *T. cruzi* genomics and molecular biology were being achieved, as exemplified by the first publication of the *T. cruzi* genome sequence, paving the way for a greater understanding of the parasite biology and, consequently, to the discovery of novel drug targets.[25]

However, the major developments came in the past 10 years, with the introduction of high throughput screening (HTS) technologies in drug discovery for neglected diseases. Screening of large compound datasets, expressly pushed forward by public and philanthropic funding, public–private partnerships and non-governmental project management entities, allowed hit prospection against diverse important pathogens, including *T. cruzi*. These initiatives connected the expertise in reference laboratories and academic institutes with the pharmaceutical and biotech corporations, which provided know-how in the drug discovery process and access to large compound libraries reviewed.[26–29]

With the introduction of automated screening, hundreds of thousands of molecules could be tested for the first time against the *T. cruzi*, either in viability assays suitable to automation, as discussed above, or against specific isolated structures (i.e. target-based assay).[30] The possibility to screen for a large quantity of potential drug candidates allows HTS technology to optimize the drug discovery process, saving time and reducing costs.

Viability assays are a time-tested strategy that has led to the successful discovery of novel drugs for microbial infections.[31–33] The main advantage of this type of approach is that it exempts the need of prior-validated targets, thus saving valuable research time and resources, and decreasing the risks of downstream failure of compounds due to poor translation of target relevance in experimental models to actual disease. In addition, viability assays select compounds that are capable of exerting antiparasitic activity in the cellular milieu, while target-based approaches often require secondary screens to confirm that the compounds of interest have indeed activity against the living parasite.[34]

High content screening (HCS) assays, also known as phenotypic assays, are the state-of-the-art for *in vitro* screening of compounds that interfere with parasite viability. An advantage of HCS is that the unbiased strategy does not rely on prior validation of targets, which speeds up the process considerably. Furthermore, the compound mode of action can affect a non-described target, or the molecule might act on more than one biological route simultaneously. HCS also provides a broad, early indication of a compound cytotoxicity profile based on the morphological effect upon mammalian cell and on cell count; and, in the case of antichagasic drug screening, an indication of compound selectivity against the intracellular

parasite – while further complementary assays are necessary to determine cytotoxicity and selectivity for fluorescence-based assays (either cell or target based). With a higher probability of discovering compounds that act on novel targets and thus can potentially become first-in-class drugs, there has been a significant increase in the contribution of phenotypic assays to drug discovery programs in the past decade.[35] In the case of Chagas disease and other neglected tropical diseases, there are so few treatment options and validated targets available that phenotypic assays can greatly contribute to the discovery of both new drugs and new targets.

The HCS methodology is based on automated imaging followed by data extraction, processing and analysis by specific software. This setup enables qualitative and quantitative systematic evaluations of varied cellular phenomena. The system became a drug discovery tool for academic use after the launching of modern commercial devices in more affordable and compact yet powerful versions. A typical HCS image analysis workflow is depicted in Figure 1.

Among the limitations of HCS approaches are great need of data storing and management capacity and the relatively low speed of HCS data acquisition and analysis, when compared to fast-reading assays, such as colorimetric/fluorescent/luminescent viability or target-based assays.[36] Considering complex cellular stress-mediated response and its higher sensitivity to micro-environmental variations (mechanical forces and thermal oscillation),[37] cell-based assays also tend to present lower reproducibility when compared to target-based assays.

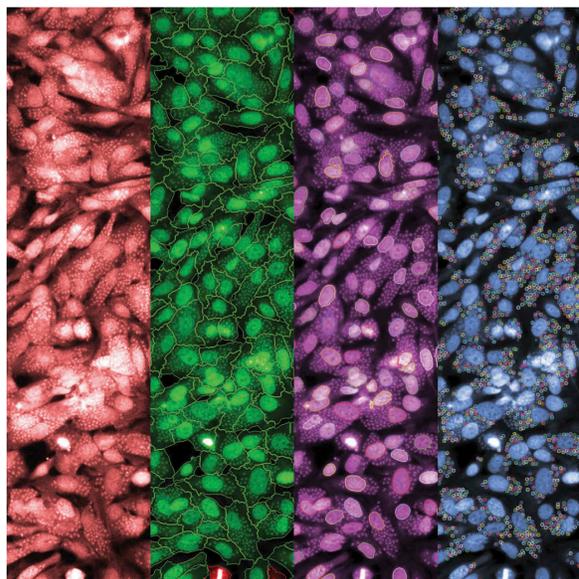


Figure 1. High content screening image analysis workflow for antichagasic drug discovery. Monolayers of U2OS cell line were infected with *T. cruzi* trypomastigotes of the Y strain. Parasite and host cell were fixed and stained with Draq5 at 48 h after infection. Panels from left to right show: 1) raw image of U2OS cells infected with *T. cruzi* Y strain amastigotes; 2) segmentation of host cell cytoplasm; 3) segmentation of host cell nuclei; 4) segmentation of amastigotes. Individual host cell nuclei and amastigotes are depicted in a range of different colors to facilitate visualization. Reproduced from [21] with permission of Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.

Despite these limitations, HCS assays remain the ultimate choice for testing compound libraries against intracellular *T. cruzi* amastigotes. To date, a few variations of HCS assays have been used for drug screening against *T. cruzi*. When the image analysis method is well validated, no statistical difference is observed between conventional manual inspection and automated quantification for a *T. cruzi* image-based assays (Nohara et al.[38] and our unpublished observations). Both proprietary and commercially available algorithms for HCS data analysis based on single-channel imaging of DNA dyes, staining both parasites' and host cells' nuclei have been reported, with a variety of cell lines used as host cells.[39–42]

3. Recent advances in early drug discovery for Chagas disease

While there is still a considerable volume of drug screening against *T. cruzi* being carried out in small scale in academic labs worldwide, a few screening campaigns have been performed in the past years, contributing to the discovery of several novel compounds as starting points of drug discovery programs. The largest campaigns reported were the screen of approximately 300,000 compounds by the Broad Institute [43] and, recently, 1.8 million compounds from the GSK collection. [44] In both cases, the primary screening was performed using the beta-galactosidase *T. cruzi* assay. As discussed earlier, this assay has a colorimetric readout and provides an indirect measure of number viable amastigotes in host cells. While this approach can result in fast selection of compounds for confirmatory screens, both screens led to a selection of a large proportion of hits associated with CYP51 inhibition among hits, suggesting that CYP51 is a major drug target in *T. cruzi*. [44,45]

Recent studies, however, raise the question of whether the overrepresentation of CYP51 inhibitors among hits from these screens might be at least in part attributed to assay methodological limitations. The beta-galactosidase assay has a longer period of drug exposure, usually 4 days, while most HCS assays have lower compound exposure periods, normally 2–3 days, and it has been proposed that the longer exposure period favors activity of CYP51 inhibitors, which require depletion of intracellular pools of ergosterol to exert activity on the *T. cruzi*. [42,46,47] Another possibility that might contribute to the high proportion of CYP51 inhibitors is that the beta-galactosidase reporter was transfected into a clone of the Tulahuen strain of *T. cruzi*, which has been found more susceptible to CYP51 inhibitors in general, possibly due to the presence of a single copy of TcCYP51 gene. [47,48]

It is important to know if anti-*T. cruzi* compounds discovered through viability screens are indeed targeting CYP51 and ergosterol biosynthesis. Two triazole compounds that inhibit CYP51 and had demonstrated anti-*T. cruzi* activity both *in vitro* and *in vivo*, [49–51] posaconazole and ravuconazole (the latter in the form of a prodrug, E1224), were recently subjected to clinical trials in Chagas disease patients, after decades without a single promising drug candidate reaching this stage. However, frustrating levels of treatment failure occurred in both studies, possibly due to insufficient efficacy of these triazoles as monotherapy, as data later obtained *in*

vitro and in animal models suggest.[47,52,53] Thus counter-screening of compounds with unknown molecular target against TcCYP51 is recommended when it is intended to de-prioritize or avoid this class of inhibitors.[20,54]

Often hit compounds emerging from screening campaigns still need to undergo through a series of secondary screens to better profile compound activity. Among the few assays developed so far for Chagas disease drug discovery, compound profiling against a panel of *T. cruzi* strains, the determination of compound killing kinetics (time-kill or time-to-kill assay), reversibility (wash-out assay) and compound testing against trypomastigotes are among the recently developed assays that are currently considered critical points in drug screening cascades.[54]

As mentioned earlier, *T. cruzi* is a genetically diverse organism with great phenotypically variation both intra and inter-DTU; drug susceptibility is a well-documented phenotypic variation in the parasite, both *in vitro* and *in vivo*.[55–58] This variation should be taken into consideration in drug discovery programs for Chagas disease, as a recent study has shown *T. cruzi* strains and clones from all six current phylogenetic groups showed wide variations in terms of drug susceptibility against chagasic drugs and drug candidates in a standardized *in vitro* assay.[47] In this study, CYP51 inhibitors performed poorly against most *T. cruzi* strains. The same study reported that differences in efficacy against strains correlated with compound killing kinetics. Benznidazole and nifurtimox were the fastest to kill *T. cruzi* and with the best efficacy profile against all strains and clones tested, suggesting that compounds that are fast to kill might have a broad-spectrum activity against *T. cruzi*. Two other studies have also found that the CYP51 inhibitor posaconazole could not promote parasitological cure in animal models, and was inferior in efficacy when compared to benznidazole, regardless of the mice or parasite strain used.[52,53] Clinical findings also point to variable efficacy of benznidazole, and consequently variable degrees of parasitological cure in the treated individuals, depending on the geographical location. This observation suggests that the drug susceptibility of the parasite (and likely the host's genetic background as well) also play a role in the treatment outcome.[19,18]

Assays for compound reversibility, also known as washout assays, are also important, as these assays can determine whether a compound can eradicate *T. cruzi* infection *in vitro* [59] and, combined with time-to-kill studies, provide knowledge of the compound concentration and time of exposure needed to achieve cure *in vivo*. Finally, assays against trypomastigote have also been suggested as important to be performed at some point during the screening cascade for Chagas disease.[54] Interestingly, several compounds can present differential activity against trypomastigotes, epimastigotes, and intracellular amastigotes, sometimes with significant differences [Refs. 57,60 and our unpublished observations]. While some variation can be attributed to differential metabolic profile and protein expression among different stages of *T. cruzi* life cycle, methodological differences that are intrinsic to assays can also at least partially explain differences in results from independent laboratories (our unpublished observations). Albeit it is still not clear whether

compound activity against trypomastigotes is clinically relevant, it is considered important to know whether the compound in question is active against trypomastigotes and this information can be used to de-prioritize compounds, when several series are available for further development.[54]

As results from clinical studies become publicly available, it becomes paramount that researchers working in drug discovery make an effort to develop improved *in vitro* and *in vivo* assays that can better reproduce clinical findings and key aspects of the human disease. In this sense, it became evident that benznidazole is still the best chemotherapy option when parasitological cure and efficacy is considered, especially in acute and indeterminate forms of the disease, and possibly for the chronic patients as well.[20,18,61] However, the results of the Benznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) study, a decade-long randomized clinical trial that evaluated the benefit of etiological treatment of Chagas cardiomyopathy, were frustrating in demonstrating that etiological treatment with benznidazole is not sufficient for resolving chagasic cardiomyopathy.[19]

4. Target discovery and validation through target deconvolution

A significant amount of new chemical entities have been discovered using whole cell assays and phenotypic approaches, precluding the need of a validated target. However, the knowledge of the molecular target and mechanism of action of a compound can greatly aid the development of optimized molecules and facilitate further compound development, especially regarding chemical optimization of the compound – the more you know about a compound, the better. In this sense, forward chemical genetics approaches and whole-genome sequencing, proteomic, and metabolomics studies of drug resistant strains are strategies that may help to identify targets of compounds emerging from phenotypic screening campaigns, a process also known as target deconvolution.[62]

Advanced genomic and proteomic techniques enable the identification and study of target genes and proteins direct or indirectly related to compounds mode of action. In a chemical-genomic approach used to identify a hit compound target, an efficacious antiprotozoan inhibitor was used to select resistant *T. cruzi* epimastigotes throughout long-term *in vitro* culture in the presence of the compound. The whole-genome sequencing revealed a mutation in *T. cruzi* cytochrome *b*, a component of mitochondrial respiratory chain complex III. The measurement of oxygen consumption and inhibition of the cytochrome complex III further confirmed the potential target.[63]

Several tools can be approached for narrowing down possible targets of phenotypic screening hit compound. One example is chemical proteomic methods, in which classic affinity chromatography is used for specific target isolation from the complex proteome throughout direct interaction of target protein(s) with the small molecule immobilized to a chromatography resin; the eluted protein is subsequently identified through direct or indirect sequencing and bioinformatics.[64] Although straightforward and extensively utilized,

this technique demands tedious washing procedures to avoid nonspecific protein binding, but most of all depends on extensive knowledge of the structure–activity relationship and ideally of the molecular mechanism of action. Otherwise, the optimal structural modification and method for binding the inhibitor to the solid matrix must be determined empirically, usually leading to several attempts of trial and error until the molecule can be linked to the matrix without impairment in its original bioactivity.[65] A recent study identified the oral drug lapatinib, used in combination treatment of breast cancer, and other tyrosine kinase inhibitors as having trypanocidal activity *in vitro* against *T. brucei*, the causative agent of Human African trypanosomiasis (HAT). In order to identify the drug target, the parasite lysate was adsorbed to an ATP-sepharose matrix and the column-bounded protein were eluted with the inhibitors, followed by analysis by mass spectrometry. This strategy resulted to the discovery of a new family of tyrosine protein kinases, proposed as a drug target in the African trypanosome.[66]

Another promising new approach is the drug affinity responsive target stability (DARTS). This technique relies on the principle that proteins bound to ligands (in this case, small molecules) are less susceptible to proteolysis, and can thus be identified in limited proteolysis assays. The major advantage is that DARTS does not depend on chemical modification of the small molecule (i.e. by immobilization to a column or by tagging with fluorophores), and can be applied on crude cell lysates.[67] An alternative target deconvolution approach is the activity-based protein profiling, which consists in the use of activity-based probes, available for specific classes of enzymes,[68] and has been successfully applied in the identification of proteins involved in host–parasite interactions.[69,70]

T. cruzi lacks a functional RNAi pathway,[25] and genetic manipulation of the parasite is laborious and difficult to achieve. Nonetheless, RNAi screening has been developed for the related parasite *T. brucei*, and has paved the way for a deeper understanding of the mechanism of action of nifurtimox, a drug active against both trypanosomes.[71,72] RNAi screens have also been used to gain knowledge of host proteins involved in the infection process. In order to investigate which host cell factors played essential role in *T. cruzi* trypomastigote invasion of human cells, an image-based genome-wide RNAi screening was performed using a printed human siRNA array transfecting a host cell line of human origin, which was subsequently challenged with *T. cruzi* trypomastigotes; the effect of the different siRNA on the host cell and the *T. cruzi* infection was evaluated by high content analysis. It was found that host genes encoding for cellular membrane proteins or proteins of the TGF-beta pathway are associated with the infection process.[73] Another similar RNAi study has linked *T. cruzi* intracellular growth with the mTOR pathway and host cell metabolism.[74]

Mammalian and protozoan cells share structurally similar enzymes, such as essential kinases, reductases, and dehydrogenases, yet their evolutionary distance resulted in evolution of homologues in differential enzymatic pathways and signaling cascades. Thus, several parasite proteins share similarities (albeit weakly) with human counterparts; these differences can be advantageously used to develop selective drug inhibitors.[75] As eukaryotic protein kinases have been extensively studied and exhaustively assayed for cancer therapy,[65] the target (and drug) repurposing approach is being currently applied against distinct protozoan species.[64] Clinical and pre-clinical inhibitors of human phosphoinositide-3-kinase and mammalian target of rapamycin (mTOR) kinase were

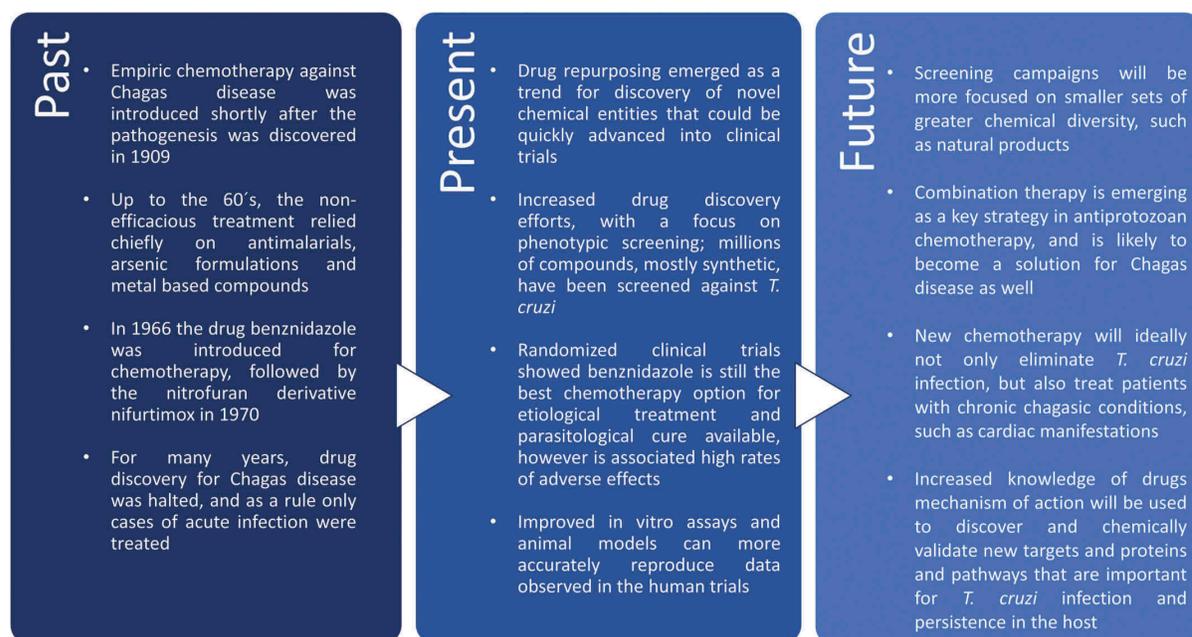


Figure 2. Overview of major tendencies of Chagas disease drug discovery.

assayed against distinct trypanosomatids species (*T. cruzi*, *T. brucei*, and *Leishmania* sp.), and an advanced clinical candidate against solid tumors (NVP-BEZ235) presented potential *in vitro* antiparasitic growth within nanomolar range concentration. [76] And these are but some of the existing drugs available for repurposing, and that provide new pathways for the discovery and validation of novel drug targets in trypanosomes.

In addition to the described techniques, numerous other approaches can be used to dissect the potential drug molecular functioning within the multiple pathway host–parasite interaction scenarios, not only by bolstering drug discovery efforts but also by aggregating essential knowledge to improve the understanding of this complex disease.

5. Conclusion

Drug discovery for Chagas disease has evolved from limited and laborious compound testing in manual assays to sophisticated *in vitro* and *in vivo* assays that accelerated the discovery of novel and promising compounds (Figure 2). Whole-cell, viability-based screening approaches are increasingly becoming a major strategy in the discovery of new drugs, and neglected tropical diseases are no exception. Although knowledge of the target can positively contribute to the drug discovery process, it is not imperative to the successful discovery and optimization of new compounds. In the case of Chagas disease, there is little consensus on what are the *in vitro* and *in vivo* experimental models that will result in proper and meaningful validation of targets that are relevant, or even essential, in Chagas disease.

In recent years, phenotypic assays have been used to screen large compound collections against *T. cruzi*, generating a large number of compounds that are being taken into drug discovery programs for lead optimization. Secondary assays recently developed present a good correlation with *in vivo* models and provide relevant information for compound prioritization. Hit and lead compounds can be used for target discovery in chemical genetics approaches, and knowledge of the target can then be used in the drug discovery process to optimize compound activity, and increase our knowledge of the disease.

6. Expert opinion

HCS assays are associated with some limitations: they are subjected to greater variability than target-based approaches; in the case of *T. cruzi* drug screening, often carried out in academic or not-for-profit institutions with more limited resources, HCS equipment and assay cost can be prohibitive. Despite these limitations, *T. cruzi* HCS assays are nonetheless the best approach available for drug screening for Chagas disease because of its considerable advantages and greater cost–benefit relationship: HCS assays often are more sensitive than other viability-based approaches, such as whole-well fluorescence or luminescence-based assays. This increment in sensitivity can result in important differences in compound profiling – a drug that is highly efficacious in the colorimetric assay may actually be only moderately efficacious in the HCS visual assays. Additionally, HCS assays are shorter in time (due to higher sensitivity), allows for a more accurate for estimation of compound selectivity toward the parasite in the same

reading and is apparently less biased toward the selection of CYP51 inhibitors, although further experiments must be performed to demonstrate whether this CYP51 bias can be at least partially attributed to the choice of the Tulahuen clone for drug screening.

If combined, the major screening campaigns undertaken for Chagas disease have tested more than 2.5 million screening points, likely with a partial overlap in terms of chemical diversity of synthetic compounds. These initiatives will result in the discovery of several new promising leads and hopefully in drug candidates. In the coming years, screening campaigns should shift to less explored areas of the chemical space, such as natural products, in order to keep producing new drug candidates that could serve as backups for compounds currently more advanced in the pipeline.

As more clinical data on Chagas disease chemotherapy becomes available, the gained knowledge should be used to improve current research models. This increased knowledge, together with technological advances in 3D assays and in the use of induced pluripotent stem cells (iPSCs), will also enable the development of more complex HCS assays that can better reproduce complex human tissues and organs.

Several studies in the past years have clearly demonstrated that benznidazole, the standard of care for Chagas disease, presents variable clinical efficacy for etiological treatment of Chagas disease, depending on the origin of the patient (which implies that both host and parasite genetic background are important for clinical outcome). Benznidazole is also associated with high rates of adverse effects and does not seem to be beneficial in improving clinical prognosis for chronic cardiac patients. Thus, new treatment options are still urgently needed, and ideally should combine one or more drugs with efficacious antiparasitic activity with drugs for clinical management of chronic patients with cardiac and digestive manifestations. And while the scientific community has now several new assays and technologies that will become fundamental in the discovery of novel chemical entities with anti-*T. cruzi* activity, there is still a lack of *in vitro* and *in vivo* models that can accurately reproduce disease pathogenesis and ‘reversely translate’ clinical findings into models compatible, in terms of time and costs, with drug discovery programs.

It is likely and highly desirable that we see an increasing trend in the direction of using novel compounds and drugs as probes in the discovery of new drug targets. Chemical genetics approaches are likely to become an important strategy in the Chagas disease research, given the lack of tools and difficulties associated with genetics in *T. cruzi*. A combination of scientific rigor and *in vitro* and *in vivo* screening technologies with the gain in understanding of the most relevant disease targets and pathways will eventually – hopefully soon – lead to the discovery of new and better drugs to treat Chagas disease.

Acknowledgements

The authors would like to thank Lucio Freitas Junior for critically reviewing the manuscript.

Financial and competing interests disclosure

C Haddad Franco has received a doctorate scholarship from the Brazilian Research Council (CNPq). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

ORCID

Carolina B. Moraes  <http://orcid.org/0000-0002-0689-2770>

Caio H. Franco  <http://orcid.org/0000-0003-2467-9401>

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
- of considerable interest

1. World Health Organisation. Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases: second WHO report in neglected tropical diseases. Geneva: World Health Organisation; 2013.
2. Bern C, Montgomery SP. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. *Clin Infect Dis*. 2009;49(5):e52–e54. doi:10.1086/605091.
3. Coura JR. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions—a comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(3):277–282. doi:10.1590/0074-0276140362.
4. Kirchhoff LV, Paredes P, Lomeli-Guerrero A, et al. Transfusion-associated Chagas disease (American trypanosomiasis) in Mexico: implications for transfusion medicine in the United States. *Transfusion*. 2006;46(2):298–304. doi:10.1111/j.1537-2995.2006.00715.x.
5. Kransdorf EP, Zakowski PC, Kobashigawa JA. Chagas disease in solid organ and heart transplantation. *Curr Opin Infect Dis*. 2014;27(5):418–424. doi:10.1097/QCO.0000000000000088.
6. Sánchez LV, Ramírez JD. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. *Parasitology*. 2013;140(2):147–159. doi:10.1017/S0031182012001394.
7. Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104:1051–1054.
8. Vago AR, Andrade LO, Leite AA, et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am J Pathol*. 2000;156(5):1805–1809.
9. Lewis MD, Llewellyn MS, Yeo M, et al. Recent, independent and anthropogenic origins of *Trypanosoma cruzi* hybrids. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(10):e1363. doi:10.1371/journal.pntd.0001363.
10. Macedo AEAM, Machado CR, Oliveira RP, et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004;99(1):1–12. doi:10.1590/0074-02762004000100001.
11. Miles MA, Llewellyn MS, Lewis MD, et al. The molecular epidemiology and phylogeography of *Trypanosoma cruzi* and parallel research on *Leishmania*: looking back and to the future. *Parasitology*. 2009;136(12):1509–1528. doi:10.1017/S0031182009990977.
12. Coura JER, Borges-Pereira JE. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011;106(6):641–645.
13. Rassi AJ, Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). *Infect Dis Clin North Am*. 2012;26(2):275–291. doi:10.1016/j.idc.2012.03.002.
14. de Freitas VLT, da Silva SCV, Sartori AM, et al. Real-time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* coinfection with and without Chagas disease reactivation: association with HIV viral load and CD4 level. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011;5(8):e1277. DOI:10.1371/journal.pntd.0001370.
15. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann Intern Med*. 2006;144(10):724–734.
16. Pinazo MI-JUS, Espinosa G, Cortes-Lletget C, et al. Immunosuppression and Chagas disease: a management challenge. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013;7(1):e1965. doi:10.1371/journal.pntd.0001965.
17. Pérez-Molina JA, Pérez-Ayala A, Moreno S, et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. *J Antimicrob Chemother*. 2009;64(6):1139–1147. doi:10.1093/jac/dkp357.
18. Yun O, Lima MA, Ellman T, et al. Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of medicins sans frontieres. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(7):e488. doi:10.1371/journal.pntd.0000488.
19. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, et al. Randomized trial of benznidazole for chronic Chagas' cardiomyopathy. *N Engl J Med*. 2015;373(14):1295–1306. doi:10.1056/NEJMoa1507574.
- **The results of the BENEFIT trial, highlighting two major limitations of benznidazole treatment for Chagas disease: safety and variable efficacy.**
20. Molina I, Gomez I Prat J, Salvador F, et al. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. *N Engl J Med*. 2014;370(20):1899–1908. doi:10.1056/NEJMoa1313122.
- **This study was the first to show that the CYP51 inhibitor posaconazole had a much inferior efficacy when compared to benznidazole in the parasitological treatment of Chagas disease.**
21. Zingales B, Zingales B, Miles MA, et al. Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2014;109(6):828–833. doi:10.1590/0074-0276140156.
22. Buckner FS, Verlinde CL, La Flamme AC, et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(11):2592–2597.
- **The basis for modern antichagasic drug screening.**
23. Bot C, Hall BS, Bashir N, et al. Trypanocidal activity of aziridinyl nitrobenzamide prodrugs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(10):4246–4252. doi:10.1128/AAC.00800-10.
24. Canavaci AMC, Bustamante JM, Padilla AM, et al. In vitro and in vivo high-throughput assays for the testing of anti-*Trypanosoma cruzi* compounds. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4:e740. doi:10.1371/journal.pntd.0000740.g007.
25. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005;309(5733):409–415. doi:10.1126/science.1112631.
26. Maser P, Wittlin S, Rottmann M, et al. Antiparasitic agents: new drugs on the horizon. *Curr Opin Pharmacol*. 2012;12(5):562–566. doi:10.1016/j.coph.2012.05.001.
27. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, et al. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2012;2:11–19. doi:10.1016/j.ijpddr.2012.01.003.
28. Burrows JN, Burlot E, Campo B, et al. Antimalarial drug discovery – the path towards eradication. *Parasitology*. 2014;141(1):128–139. doi:10.1017/S0031182013000826.
29. Don R, loset J-R. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*. 2014;141(1):140–146. doi:10.1017/S003118201300142X.
30. Pink R, Hudson A, Mourès M-A BM. Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2005;4(9):727–740. doi:10.1038/nrd1824.
31. Payne DJ, Gwynn MN, Holmes DJ, et al. Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;6(1):29–40. doi:10.1038/nrd2201.
32. Swinney DC, Anthony J. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(7):507–519. doi:10.1038/nrd3480.

- A very interesting review on trends of the pharmaceutical industry and drug discovery.**
33. Keller TH, Shi P-Y, Wang Q-Y. Anti-infectives: can cellular screening deliver? *Curr Opin Chem Biol* 2011;15(4):529–533. doi:10.1016/j.cbpa.2011.06.007.
34. Gilbert IH. Drug discovery for neglected diseases: molecular target-based and phenotypic approaches. *J Med Chem*. 2013;56(20):7719–7726. doi:10.1021/jm400362b.
35. Vincent F, Loria P, Pregel M, et al. Developing predictive assays: the phenotypic screening “rule of 3”. *Sci Transl Med*. 2015;7(293):293ps15–293ps15. doi:10.1126/scitransmed.aab1201.
- An interesting article that discusses important methods and approaches to phenotypic screening.**
36. Butera JA. Phenotypic screening as a strategic component of drug discovery programs targeting novel antiparasitic and antimycobacterial agents: an editorial. *J Med Chem*. 2013;56(20):7715–7718. doi:10.1021/jm400443k.
37. Zanella F, Lorens JB, Link W. High content screening: seeing is believing. *Trends Biotechnol*. 2010;28(5):237–245. doi:10.1016/j.tibtech.2010.02.005.
38. Nohara LL, Lema C, Bader JO, et al. High-content imaging for automated determination of host-cell infection rate by the intracellular parasite. *Trypanosoma Cruzi. Parasitol Int*. 2010;59(4):565–570. doi:10.1016/j.papint.2010.07.007.
39. Moon S, Siqueira-Neto JL, Moraes CB, et al. An image-based algorithm for precise and accurate high throughput assessment of drug activity against the human parasite. *Trypanosoma Cruzi. Plos ONE*. 2014;9(2):e87188. doi:10.1371/journal.pone.0087188.
40. Sykes ML, Avery VM. A luciferase based viability assay for ATP detection in 384-well format for high throughput whole cell screening of *Trypanosoma brucei* bloodstream form strain 427. *Parasit Vectors*. 2009;2(1):54. doi:10.1186/1756-3305-2-54.
41. Alonso-Padilla J, Cotillo I, Presa JL, et al. Automated high-content assay for compounds selectively toxic to *Trypanosoma cruzi* in a myoblastic cell line. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(1):e0003493. doi:10.1371/journal.pntd.0003493.
42. Neitz RJ, Chen S, Suppek F, et al. Lead identification to clinical candidate selection: drugs for Chagas disease. *J Biomol Screen*. 2015;20(1):101–111. doi:10.1177/1087057114553103.
- A recent study that compares image-based and fluorescence-based whole cell screening for *T. cruzi*.**
43. Bettiol E, Samanovic M, Murkin AS, et al. Identification of three classes of heteroaromatic compounds with activity against intracellular *Trypanosoma cruzi* by chemical library screening. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3(2):e384. doi:10.1371/journal.pntd.0000384.t001.
44. Pena I, Pilar Manzano M, Cantizani J, et al. New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource. *Sci Rep*. 2015;5:8771. doi:10.1038/srep08771.
- The largest screening campaign ever performed for Chagas disease, leishmaniasis and human African trypanosomiasis, resulting in the discovery of several new compounds and the production of a curated compound set, the ‘kinetoplastid boxes’.**
45. Keenan M, Alexander PW, Chaplin JH, et al. Selection and optimization of hits from a high-throughput phenotypic screen against *Trypanosoma cruzi*. *Future Med Chem*. 2013;5(15):1733–1752. doi:10.4155/fmc.13.139.
46. Urbina JA, Lira R, Visbal G, et al. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(9):2498–2502.
47. Moraes CB, Giardini MA, Kim H, et al. Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development. *Sci Rep*. 2014;4:4703. doi:10.1038/srep04703.
- This study demonstrated that CYP51 inhibitors have inferior antiparasitic activity when compared to benznidazole and nifurtimox, using a panel of divergent *T. cruzi* strains.**
48. Cherkesova TS, Hargrove TY, Vanrell MC, et al. Sequence variation in CYP51A from the Y strain of *Trypanosoma cruzi* alters its sensitivity to inhibition. *FEBS Letters*. 2014;588(21):3878–3885. doi:10.1016/j.febslet.2014.08.030.
- The first description of *TcCYP51* polymorphism among *T. cruzi* strains and demonstration of variable susceptibility to CYP51 inhibitors.**
49. Urbina JA, Payares G, Contreras LM, et al. 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):1771–1777.
50. Urbina JA, Payares G, Sanoja C, et al. In vitro and in vivo activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2003;21(1):27–38.
51. Olivieri BP, Molina JT, de Castro SL, et al. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(1):79–83. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.006.
52. Francisco AF, Lewis MD, Jayawardhana S, et al. Limited ability of posaconazole to cure both acute and chronic *Trypanosoma cruzi* infections revealed by highly sensitive in vivo imaging. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(8):4653–4661. doi:10.1128/AAC.00520-15.
- New powerful whole-body, live animal imaging techniques applied to studies of drug efficacy in a Chagas disease mouse model, demonstrating (together with another study [53]) that posaconazole has an inferior antiparasitic activity when compared to benznidazole.**
53. Khare S, Liu X, Stinson M, et al. Antitrypanosomal treatment with benznidazole is superior to posaconazole regimens in mouse models of Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(10):6385–6394. doi:10.1128/AAC.00689-15.
- Together with another study [52], and using alternative models and techniques, demonstrated that posaconazole is inferior in antiparasitic properties in vivo when compared to benznidazole.**
54. Chatelain E. Chagas disease drug discovery: toward a new era. *J Biomol Screen*. 2015;20(1):22–35. doi:10.1177/1087057114550585.
55. Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1963;5:220–244.
56. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans R Society Trop Med Hyg*. 1987;81(5):755–759. DOI:10.1016/0035-9203(87)90020-4.
- The first report on *T. cruzi* strain variability in drug susceptibility to both benznidazole and nifurtimox.**
57. Neal RA, Van Bueren J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. *Trans R Society Trop Med Hyg*. 1988;82(5):709–714. doi:10.1016/0035-9203(88)90208-8.
58. Camandaroba ELP, Reis EAG, Gonçalves MS, et al. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(2):201–209.
59. Chen YT, Brinen LS, Kerr ID, et al. In vitro and in vivo studies of the trypanocidal properties of WRR-483 against *Trypanosoma cruzi*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(9):e825. doi:10.1371/journal.pntd.0000825.
60. Sykes ML, Avery VM. Approaches to protozoan drug discovery: phenotypic screening. *J Med Chem*. 2013;56(20):7727–7740. doi:10.1021/jm4004279.
61. Viotti R, Alarcon de Noya B, Araujo-Jorge T, et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(2):635–639. doi:10.1128/AAC.01662-13.
62. Terstappen GC, Schlüpen C, Raggiaschi R, et al. Target deconvolution strategies in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(11):891–903. doi:10.1038/nrd2410.
63. Khare S, Roach SL, Barnes SW, et al. Utilizing chemical genomics to identify cytochrome b as a novel drug target for Chagas disease. *PLoS Pathog*. 2015;11(7):e1005058. doi:10.1371/journal.ppat.1005058.

- **An interesting study, pioneering in the use of drug candidates as probes for the discovery of new drug targets in *T. cruzi*.**
64. Puri AW, Bogyo M. Using small molecules to dissect mechanisms of microbial pathogenesis. *ACS Chem Biol.* 2009;4(8):603–616. doi:10.1021/cb9001409.
 65. Wierzbka K, Muroi M, Osada H. Proteomics accelerating the identification of the target molecule of bioactive small molecules. *Curr Opin Chem Biol.* 2011;15(1):57–65. doi:10.1016/j.cbpa.2010.10.009.
 66. Katiyar S, Kufareva I, Behera R, et al. Lapatinib-binding protein kinases in the African trypanosome: identification of cellular targets for kinase-directed chemical scaffolds. *PLoS ONE.* 2013;8(2):e56150. doi:10.1371/journal.pone.0056150.
 67. Lomenick B, Hao R, Jonai N, et al. Target identification using drug affinity responsive target stability (DARTS). *PNAS.* 2009;106(51):21984–21989. doi:10.1073/pnas.0910040106.
 68. Lee J, Bogyo M. Target deconvolution techniques in modern phenotypic profiling. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17(1):118–126. doi:10.1016/j.cbpa.2012.12.022.
 69. Hall CI, Reese ML, Weerapana E, et al. Chemical genetic screen identifies *Toxoplasma* DJ-1 as a regulator of parasite secretion, attachment, and invasion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(26):10568–10573. doi:10.1073/pnas.1105622108.
 70. Kato N, Sakata T, Breton G, et al. Gene expression signatures and small-molecule compounds link a protein kinase to *Plasmodium falciparum* motility. *Nat Chem Biol.* 2008;4(6):347–356. doi:10.1038/nchembio.87.
 71. Alsford S, Eckert S, Baker N, et al. High-throughput decoding of antitrypanosomal drug efficacy and resistance. *Nature.* 2012;482(7384):232–236. doi:10.1038/nature10771.
 72. Jones NG, Thomas EB, Brown E, et al. Regulators of *Trypanosoma brucei* cell cycle progression and differentiation identified using a kinome-wide RNAi screen. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003886. doi:10.1371/journal.ppat.1003886.
 73. Genovesio A, Giardini MA, Kwon Y-J, et al. Visual genome-wide RNAi screening to identify human host factors required for *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS ONE.* 2011;6(5):e19733. doi:10.1371/journal.pone.0019733.t001.
 74. Caradonna KL, Engel JC, Jacobi D, et al. Host metabolism regulates intracellular growth of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Host Microbe.* 2013;13(1):108–117. doi:10.1016/j.chom.2012.11.011.
 75. Choi J, El-Sayed NM. Functional genomics of trypanosomatids. *Parasite Immunol.* 2012;34(2–3):72–79. doi:10.1111/j.1365-3024.2011.01347.x.
 76. Diaz-Gonzalez R, Kuhlmann FM, Galan-Rodriguez C, et al. The susceptibility of trypanosomatid pathogens to PI3/mTOR kinase inhibitors affords a new opportunity for drug repurposing. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011;5(8):e1297. doi:10.1371/journal.pntd.0001297.

Anexo IV:

Chiara Borsari, Nuno Santarem, Juan Torrado, Ana Isabel Olías, María Jesús Corral, Catarina Baptista, Sheraz Gul, Markus Wolf, Maria Kuzikov, Bernhard Ellinger, Gesa Witt, Philip Gribbon, Jeanette Reinshagen, Pasquale Linciano, Annalisa Tait, Luca Costantino, Lucio Freitas-Junior, Carolina B. Moraes, Bruno dos Santos Pascoalino, Laura Maria Alcântara, Caio Haddad Franco, Claudia Danielli Bertolacini, Vanessa Fontana, Paloma Tejera Nevado, Joachim Clos, José María Alunda, Anabela Cordeiro-da-Silva, Stefania Ferrari and Maria Paola Costi. , **Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds**. European Journal of Medicinal Chemistry, 2017.

European Journal of Medicinal Chemistry 126 (2017) 1129–1135



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Short communication

Methoxylated 2'-hydroxychalcones as antiparasitic hit compounds



Chiara Borsari ^a, Nuno Santarem ^b, Juan Torrado ^c, Ana Isabel Olías ^{c,e},
María Jesús Corral ^{c,e}, Catarina Baptista ^b, Sheraz Gul ^d, Markus Wolf ^d, Maria Kuzikov ^d,
Bernhard Ellinger ^d, Gesa Witt ^d, Philip Gribbon ^d, Jeanette Reinshagen ^d,
Pasquale Linciano ^a, Annalisa Tait ^a, Luca Costantino ^a, Lucio H. Freitas-Junior ^f,
Carolina B. Moraes ^f, Pascoalino Bruno dos Santos ^f, Laura Maria Alcântara ^f,
Caio Haddad Franco ^g, Claudia Danielli Bertolacini ^f, Vanessa Fontana ^f,
Paloma Tejera Nevado ^g, Joachim Clos ^g, José María Alunda ^{c,e},
Anabela Cordeiro-da-Silva ^b, Stefania Ferrari ^a, Maria Paola Costi ^{a,*}

^a University of Modena and Reggio Emilia, Via Campi 103, 41125, Modena, Italy

^b Institute for Molecular and Cell Biology, 4150-180 Porto, Portugal and Instituto de Investigação e Inovação em Saúde, Universidade do Porto and Institute for Molecular and Cell Biology, 4150-180, Porto, Portugal

^c Complutense University of Madrid, 28040, Madrid, Spain

^d Fraunhofer Institute for Molecular Biology and Applied Ecology Screening Port, Hamburg, Germany

^e Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid, Spain

^f Brazilian Centre for Research in Energy and Materials, Campinas, Brazil

^g Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, D-20359, Hamburg, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2016

Received in revised form

6 December 2016

Accepted 8 December 2016

Available online 9 December 2016

Keywords:

Chalcones

Trypanosoma brucei

Trypanosoma cruzi

Leishmania infantum

Early toxicity studies

Cyclodextrins formulation

ABSTRACT

Chalcones display a broad spectrum of pharmacological activities. Herein, a series of 2'-hydroxy methoxylated chalcones was synthesized and evaluated towards *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. Among the synthesized library, compounds **1**, **3**, **4**, **7** and **8** were the most potent and selective anti-*T. brucei* compounds (EC₅₀ = 1.3–4.2 μM, selectivity index >10-fold). Compound **4** showed the best early-tox and antiparasitic profile. The pharmacokinetic studies of compound **4** in BALB/c mice using hydroxypropyl-β-cyclodextrins formulation showed a 7.5 times increase in oral bioavailability.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

The kinetoplastid parasites *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. are responsible for potentially fatal insect-borne diseases namely, respectively, Human African Trypanosomiasis (HAT), Chagas disease and Leishmaniasis [1–3]. Despite the serious health, economic and social consequences of these parasitic infections, there are no available vaccines. Therefore,

disease control relies only on chemotherapy and prophylaxis. The available drugs suffer from many drawbacks including toxicity, poor efficacy and drug resistance [4]. Hence, there is an urgent requirement for new, safe and effective drugs. Phenotypic screening approaches have been successfully used in the field of neglected diseases, particularly for the treatment of HAT [5]. Two compounds, discovered through a phenotypic screening, have recently been progressed into clinical trials by DNDI: fexinidazole, a nitroimidazole, and SCYX-7158, an oxaborole [6]. In the drug discovery process for new antileishmanial and antitrypanosomal drugs, phenotypic screening and follow up optimization were largely applied and provided a wide range of chemical structures,

* Corresponding author.

E-mail addresses: Gesa.Witt@ime.fraunhofer.de (G. Witt), Philip.Gribbon@ime.fraunhofer.de (P. Gribbon), mariapaola.costi@unimore.it (M.P. Costi).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.12.017>

0223-5234/© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Anexo V:

Pasquale Linciano, Carolina B. Moraes, Laura M. Alcantara, Caio H. Franco, Bruno Pascoalino, Lucio H. Freitas-Junior, Sara Macedo, Nuno Santarem, Anabela Cordeiro-da-Silva, Sheraz Gul, Gesa Witt, Maria Kuzikov, Bernhard Ellinger, Stefania Ferrari, Rosaria Luciani, Antonio Quotadamo, Luca Costantino and Maria Paola Costi. **Aryl thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2018.

Accepted Manuscript

Aryl thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections

Pasquale Linciano, Carolina B. Moraes, Laura M. Alcantara, **Caio H. Franco**, Bruno Pascoalino, Lucio H. Freitas-Junior, Sara Macedo, Nuno Santarem, Anabela Cordeiro-da-Silva, Sheraz Gul, Gesa Witt, Maria Kuzikov, Bernhard Ellinger, Stefania Ferrari, Rosaria Luciani, Antonio Quotadamo, Luca Costantino, Maria Paola Costi



PII: S0223-5234(18)30056-4

DOI: [10.1016/j.ejmech.2018.01.043](https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2018.01.043)

Reference: EJMECH 10120

To appear in: *European Journal of Medicinal Chemistry*

Received Date: 15 August 2017

Revised Date: 12 January 2018

Accepted Date: 14 January 2018

Please cite this article as: P. Linciano, C.B. Moraes, L.M. Alcantara, C.H. Franco, B. Pascoalino, L.H. Freitas-Junior, S. Macedo, N. Santarem, A. Cordeiro-da-Silva, S. Gul, G. Witt, M. Kuzikov, B. Ellinger, S. Ferrari, R. Luciani, A. Quotadamo, L. Costantino, M.P. Costi, Aryl thiosemicarbazones for the treatment of trypanosomatidic infections, *European Journal of Medicinal Chemistry* (2018), doi: 10.1016/j.ejmech.2018.01.043.

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Anexo VI:

Damien Bosc, Elisabeth Mouray, Sandrine Cojean, Caio Haddad Franco, Philippe M. Loiseau, Lucio H. Freitas-Junior, Carolina Borsoi Moraes, Philippe Grellier and Joëlle Dubois. **Highly improved antiparasitic activity after introduction of an N - benzylimidazole moiety on protein farnesyltransferase inhibitors.** European Journal of Medicinal Chemistry, 2016.

European Journal of Medicinal Chemistry 109 (2016) 173–186



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Research paper

Highly improved antiparasitic activity after introduction of an N-benzylimidazole moiety on protein farnesyltransferase inhibitors



Damien Bosc ^a, Elisabeth Mouray ^b, Sandrine Cojean ^c, Caio Haddad Franco ^d, Philippe M. Loiseau ^c, Lucio H. Freitas-Junior ^d, Carolina Borsoi Moraes ^d, Philippe Grellier ^b, Joëlle Dubois ^{a,*}

^a CNRS UPR2301, Institut de Chimie des Substances Naturelles, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

^b Unité Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes (MCAM, UMR 7245), Muséum National d'Histoire Naturelle, Sorbonne Universités, CNRS, CP52, 57 Rue Cuvier, 75005 Paris, France

^c Univ Paris-Sud, CNRS, BioCIS-UMR 8076, Chimiothérapie Antiparasitaire, LabEx LERMIT, Faculté de Pharmacie, 5 Rue J.-B. Clément, Châtenay-Malabry, F-92296, France

^d Chemical Biology and Screening Platform, National Laboratory of Biosciences, National Center for Research on Energy and Materials, Rua Giuseppe Maximo Scolfaro, 10000, Campinas, SP 13083-100, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 June 2015

Received in revised form

22 December 2015

Accepted 23 December 2015

Available online 29 December 2015

Keywords:

Arylthiophene
Protozoan parasites
Trypanosoma
Leishmania
Malaria

ABSTRACT

In our search for new protein farnesyltransferase inhibitors with improved antiparasitic activities, we modified our previously developed 3-arylthiophene series of inhibitors by replacing the thioisopropyl group by different substituted imidazolylmethanamino moieties. Twenty four new derivatives were synthesized and evaluated against human and parasite farnesyltransferases, and their anti-parasitic activity was determined against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania donovani*. Introduction of a N-p-substituted-benzylimidazole led to significantly increase the inhibition of parasite proliferation in the submicromolar range. The structure of the best inhibitors was parasite dependent. Three compounds possess IC₅₀ values at the same range as the reference miltefosine against *L. donovani* proliferation and other new derivatives display high level of anti-trypanosomal activity against *T. cruzi*, higher or in the same order of magnitude as the reference compounds benzimidazole and nifurtimox.

© 2015 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Neglected tropical diseases (NTD) affect over a billion people in the world, especially in the developing world and are responsible for more than 500,000 deaths per year [1]. Human African Trypanosomiasis (African sleeping sickness), Chagas disease and leishmaniasis are NTDs all caused by protozoan parasites of *Trypanosoma* and *Leishmania* genus, respectively. Malaria, the most widespread parasitic disease, is also caused by protozoan parasites (*Plasmodium*) and still responsible for the death of hundred thousands of people every year despite the numerous efforts deployed to fight this disease. Between 1975 and 2004, only 21 new approved drugs concerned NTDs, and also malaria and tuberculosis, i.e. 1.3% of the new drugs whereas these diseases account for 11.4% of the

global illness burden [2]. Therefore there is a crucial need for new treatments that ideally should be safe, effective, affordable, and easy-to-use. In the past 12 years, many efforts have been made to elaborate collaborative approaches for drug discovery and development and to build partnerships such as Medicines for Malaria Venture (MMV) or Drugs for Neglected Disease initiative (DNDi). Despite these progresses in drug discovery for NTDs, there is still an imperative demand for new chemical entities. Among the potential targets to fight against these neglected parasitic diseases, protein farnesyltransferase (FTase) was considered of interest because farnesylated proteins are involved in cell signaling pathways [3,4]. Farnesylation is a post-translational modification of protein enabling them to anchor to the cellular membrane where they are active or to promote protein–protein interactions [5,6]. This modification occurs on proteins bearing a C-terminal CaaX motif, where C is the cysteine to be farnesylated, a is an aliphatic amino acid and X is more frequently a methionine or a glutamine. Actually, many potent protein farnesyltransferase inhibitors (FTIs) display

* Corresponding author.

E-mail address: joelle.dubois@cnrs.fr (J. Dubois).

Anexo VII:

Bruna Ferreira de Souza, Mayara Roncaglia dos Santos, Renan Pimentel de Souza, Simon Bernhard Cämmerer, Natália Aimée d'Angelo, Caio Haddad Franco, Carolina Borsoi Moraes and Lúcio H. Freitas-Junior. **Synthesis of Chiral 3-[[[(Aryl) methyl] amino]- and 3-[[[(Heteroaryl)-methyl]-amino]- quinuclidines with High Biological Activity against Intracellular Trypanosoma cruzi Amastigotes.** International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, 2016.

Simon Bernhard Cämmerer et al, IJCPs, 2016, 4(5): 272–278

CODEN (USA): IJCPNH / ISSN: 2321-3132



International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences

Journal Home Page: www.pharmaresearchlibrary.com/ijcps



Research Article

Open Access

Synthesis of Chiral 3-[[[(Aryl) methyl] amino]- and 3-[[[(Heteroaryl)-methyl]-amino]- quinuclidines with High Biological Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* Amastigotes

Bruna Ferreira de Souza¹, Mayara Roncaglia dos Santos¹, Renan Pimentel de Souza¹, Simon Bernhard Cämmerer^{1*}, Natália Aimée d'Angelo², Caio Haddad Franco³, Carolina Borsoi Moraes³ Lúcio H. Freitas-Junior^{3*}

¹Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato S/N, Cidade Universitaria Zeferino Vaz, Barão Geraldo, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

²Instituto de Ciências da Saúde - ICS, Universidade Paulista. Avenida Comendador Enzo Ferrari, 280– Swift -CEP 13043-900, Campinas - São Paulo, Brasil

³Chemical Biology and Screening Platform, Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Rua Giuseppe Maximo Scolfaro, 10.000 – Polo II de Alta Tecnologia Campinas, Brasil.

ABSTRACT

Inhibition of the sterol biosynthesis is a highly attractive strategy for chemotherapy of *Trypanosoma cruzi*, because this protozoa mainly depends on endogenous ergosterol. Various racemic, but only a few chiral quinuclidines were proven to be strong inhibitors of ergosterol biosynthesis in protozoa and fungi. In this study we describe the preparation of chiral 3-[[[(aryl) methyl] amino]- and 3-[[[(heteroaryl)methyl]-amino]quinuclidines and their evaluation as inhibitors of intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes with the aim to explore their potential for the development of new drugs against the Chagas disease. Main objective was to study the influence of the absolute configuration of the stereo center at C-3 on the biological activity on *Trypanosoma cruzi*. Most compounds showed a high biological activity against growth of intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. This is the first study comparing the biological activity of enantiomers of selected chiral 3-[[[(aryl) methyl] amino]- and 3-[[[(heteroaryl)methyl]amino]quinuclidines on *Trypanosoma cruzi* intracellular amastigotes. (S)-enantiomers exhibited a higher biological activity against this pathogenic protozoa as (R)-enantiomers. All compounds were highly selective towards the parasite and showed low cytotoxicity to host cells.

Keywords: Chiral Arylquinuclidines, *Trypanosoma cruzi*, Intracellular Amastigotes.

ARTICLE INFO

CONTENTS

1. Introduction	273
2. Experimental.	273
3. Results and Discussion.	275
4. Conclusion.	277
5. Acknowledgement.	277
6. References	277

Article History: Received 18 March 2016, Accepted 29 April 2016, Available Online 27 May 2016

*Corresponding Author

Simon Bernhard Cämmerer
Instituto de Química, Universidade Estadual de
Campinas, Rua Monteiro Lobato S/N, Cidade
Universitaria Zeferino Vaz, Barão Geraldo, CP
6154, CEP 13083-970, Campinas, Brasil.
Manuscript ID: IJCPs2952



PAPER-QR CODE

Anexo VIII:

Gabrielle Frizzo Souza, Simon Bernhard Cämmerer, Caio Haddad Franco, Laura Maria Alcantara, Carolina Borsoi Moraes and Lucio Holanda Freitas-Junior. **N-[4-[Benzyloxy] benzyl]-benzenemethaneamines with High Biological Activity against Intracellular Trypanosoma cruzi and Leishmania infantum Amastigotes.** International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences, 2016.

Simon Bernhard Cämmerer et al, IJCPs, 2016, 4(11): 570–578

CODEN (USA): IJCPNH | ISSN: 2321-3132



International Journal of Chemistry and Pharmaceutical Sciences

Journal Home Page: www.pharmaresearchlibrary.com/ijcps



Research Article

Open Access

N-[4-[Benzyloxy] benzyl]-benzenemethaneamines with High Biological Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* Amastigotes

Gabrielle Frizzo Souza¹, Simon Bernhard Cämmerer^{1*}, Caio Haddad Franco², Laura Maria Alcantara², Carolina Borsoi Moraes², Lucio Holanda Freitas-Junior^{2*}

¹Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Rua Monteiro Lobato S/N, Cidade Universitaria Zeferino Vaz, Barão Geraldo, CP 6154, CEP 13083-970, Campinas, São Paulo, Brasil.

²Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Rua Giuseppe Maximo Scolfaro. 10.000 – Polo II de Alta Tecnologia Campina – São Paulo, Brasil.

ABSTRACT

Chagas disease and Leishmaniasis, caused respectively by *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania spp.*, are neglected tropical diseases for which only unsatisfactory chemotherapeutic options are available. Therefore, there is still an urgent need to develop novel and improved pharmaceuticals for the treatment of these diseases. Inhibition of sterol biosynthesis has been proposed as a strategy for chemotherapy of *Trypanosoma spp.* and *Leishmania spp.*, because they mainly depend on endogenous ergosterol. Benzyl farnesyl amine has been proven to exhibit high inhibition of human squalene synthase (SQS), a key enzyme of cholesterol biosynthesis in man. Isosteric replacement of the farnesyl chain for benzyloxybenzyl substituent has been demonstrated to result in derivatives with stronger inhibition of human SQS and higher metabolic stability. These mimetics of benzyl farnesyl amine have never been tested for biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. In this study, a small library of substituted N-[4-[benzyloxy] benzyl]-benzenemethaneamines was prepared by chemical synthesis and tested for biological activity against these pathogenic tropical protozoa. All compounds exhibited high activity against intracellular amastigotes of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum*. N-[[4-[3',4'-Dimethoxy]-benzyloxy]benzyl]-benzenemethaneamine hydrochloride **6c** showed, with EC₅₀: 2.8 μM, the highest potency against *Trypanosoma cruzi*, comparable to the activity of the positive control benznidazole (EC₅₀: 3.0 μM), whereas (S)-α-methyl-N-[4-[benzyloxy]benzyl]-benzenemethaneamine hydrochloride **6f** presented the most potent activity against *Leishmania infantum*, with EC₅₀: 7.7 μM. The compounds presented a high selectivity towards *Leishmania infantum* amastigotes. This finding demonstrates that structurally simple SQS inhibitors have a high potential in anti-Chagas and anti-Leishmaniasis drug design. It is of great importance for the development of novel, low cost antitrypanosomal and antileishmanial drugs in emerging countries.

Keywords: Benzyl Farnesyl Amine Mimetics, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, Neglected Tropical Infectious Diseases Drug Discovery

ARTICLE INFO

CONTENTS

1. Introduction	571
2. Materials and Method.	572
3. Results and Discussion.	573
4. Conclusion.	574
5. Acknowledgement.	577
6. References	577

Article History: Received 18 September 2016, Accepted 15 October 2016, Available Online 27 November 2016

Citation: Simon Bernhard Cämmerer, et al. N-[4-[Benzyloxy] benzyl]-benzenemethaneamines with High Biological Activity against Intracellular *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania infantum* Amastigotes. *Int. J. Chem. Pharm. Sci.*, 2016, 4(11): 570-578.

Anexo IX:

Fredson T. Silva, Caio H. Franco, Denize C. Favaro, Lucio H. Freitas-Junior, Carolina B. Moraes and Elizabeth I. Ferreira. **Design, synthesis and antitrypanosomal activity of some nitrofurazone 1,2,4-triazolic bioisosteric analogues.** European Journal of Medicinal Chemistry, 2016.

European Journal of Medicinal Chemistry 121 (2016) 553–560



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Research paper

Design, synthesis and antitrypanosomal activity of some nitrofurazone 1,2,4-triazolic bioisosteric analogues



Fredson T. Silva ^a, Caio H. Franco ^b, Denize C. Favaro ^{c, d}, Lucio H. Freitas-Junior ^b, Carolina B. Moraes ^b, Elizabeth I. Ferreira ^{a, *}

^a School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 580, Bl. 13, São Paulo, São Paulo, Brazil

^b National Laboratory of Biosciences, National Center for Research on Energy and Materials, Rua Giuseppe Máximo Scolfaro, 10000, Campinas, São Paulo, Brazil

^c Institute of Chemistry, University of São Paulo, Avenida Prof. Lineu Prestes, 748, São Paulo, São Paulo, Brazil

^d Department of Chemistry, Institute of Exact Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2016
Received in revised form
25 April 2016
Accepted 26 April 2016
Available online 1 June 2016

Keywords:

Chagas disease
Molecular hybridization
Bioisosterism
Nitroheterocyclic compounds

ABSTRACT

Chagas disease, caused by *Trypanosoma cruzi*, is a parasitosis that predominates in Latin America. It is estimated that 25 million people are under the risk of infection and, in 2008, more than 10 thousand deaths were registered. The only two drugs available in the therapeutics, nifurtimox and benznidazole, showed to be more effective in the acute phase of the disease. However, there is no standard treatment protocol effective for the chronic phase. Nitrofurazone (NF), an antimicrobial drug, has activity against *T. cruzi*, although being toxic. Considering the need for new antichagasic drugs, the existence of promising new therapeutic targets, as 14 α -sterol demethylase and cruzain, and employing the bioisosterism and molecular hybridization approaches, four novel compounds were synthesized, characterized by melting point range, elemental analysis, IR and NMR spectroscopy. The compounds were tested against *T. cruzi* amastigotes in infected U2OS cells. All compounds showed selectivity towards *T. cruzi* and showed trypanocidal activity in low micromolar range. The compound **3** showed potency similar to benznidazole, but lower efficacy. These results highlight the importance of the 1,2,4-triazole, thio-semicarbazonic and nitro group moieties for designing new efficient compounds, potentially for the chronic phase of Chagas disease.

© 2016 Published by Elsevier Masson SAS.

1. Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is an infectious disease caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi* [1,2]. Predominantly present in Latin America, it is estimated to cause 7 thousand deaths yearly and approximately 7 million people are estimated of being infected worldwide. However, some studies have suggested that this number is underestimated due to failures on diagnosis and notification [3,4].

The acute stage of this illness is virtually asymptomatic and often difficult to detect, depending of the host's immune system [5]. The therapy mainly relies on nitroaromatic drugs, nifurtimox and benznidazole, which are responsible for 50–60% of parasitological cure of adults in the chronic stage and show considerable toxicity

[6]. Therefore the search for new and more effective drugs is of utmost importance.

Finding an appropriate treatment for the chronic phase of Chagas disease has been a complex and difficult challenge. Despite many molecular targets have been explored, and high potency and low toxicity molecules are being found, the clinical trials did not succeed (Merck, ClinicalTrials.gov ID NCT01377480, Hospital Universitari Vall d'Hebron Research Institute, ClinicalTrials.gov ID NCT01162967). The differences among strains of the parasite and the complexity of the interactions between parasite and host can be responsible for those drawbacks [7].

It is worth mentioning nitrofurazone, a nitroheterocyclic topic antiseptic, which is known to have antitrypanosomal activity by generating oxygen reactive species, which interferes with trypanothione reductase [8,9], a specific parasite detoxifying enzyme, and also an inhibition of cruzipain, the main parasite protease [10]. The exploration of this dual mechanism is a strategy to overcome the problems of low efficacy and parasite resistance during the

* Corresponding author.

E-mail address: hajudan@usp.br (E.I. Ferreira).

Anexo X:

Michael N. Balfour, Caio H. Franco, Carolina B. Moraes, Lucio H. Freitas-Junior and Helio A. Stefani. **Synthesis and trypanocidal activity of a library of 4-substituted 2-(1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2-yl)propan-2-ols**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2017.

European Journal of Medicinal Chemistry 128 (2017) 202–212



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Research paper

Synthesis and trypanocidal activity of a library of 4-substituted 2-(1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2-yl)propan-2-ols



Michael N. Balfour^a, Caio H. Franco^{b,1}, Carolina B. Moraes^{b,1}, Lucio H. Freitas-Junior^{b,**,1}, Hélio A. Stefani^{a,*}

^a Departamento de Farmácia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^b Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 November 2016

Received in revised form

26 January 2017

Accepted 27 January 2017

Available online 3 February 2017

Keywords:

Sonogashira

5-Endo-dig

Suzuki-Miyaura

Trypanosoma

Chagas disease

ABSTRACT

A library of 16 4-substituted 2-(1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2-yl)propan-2-ols **17–32** has been synthesized for use in biological testing against *Trypanosoma cruzi*, the protozoan parasite that causes Chagas disease. The 4-substituted 2-(1H-pyrrolo[3,2-c]pyridin-2-yl)propan-2-ols **17–32** were subjected to biological testing to evaluate their efficacy against intracellular *Trypanosoma cruzi* (Y strain) amastigotes infecting U2OS human cells, with benznidazole as a reference compound. The assay was performed in duplicate (two independent experiments) and submitted to High Content Analysis (HCA) for determination of trypanocidal activity. Three of the tested compounds presented relatively high trypanocidal activity (**19**, **22** and **29**), however severe host cell toxicity was observed concomitantly. Chemical optimization of the highly active compounds and the synthesis of more compounds for biological testing against *Trypanosoma cruzi* will be required to improve selectivity and so that a structure-activity relationship can be generated to provide a more insightful analysis of both chemical and biological aspects.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is a chronic infectious disease endemic in Latin America. The disease is caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which is transmitted to humans by blood-sucking triatomine insect vectors. Other forms of contagion are organ transplant or blood transfusion contaminated with *Trypanosoma cruzi*, transmission from mother to fetus during pregnancy (vertical transmission), or by ingestion of food or drink contaminated with live parasites [1]. The World Health Organization estimates that there are approximately 7 million people who are infected with *Trypanosoma cruzi* in the world, and although Chagas disease is endemic in Latin America, global migratory phenomena has scattered infected individuals to several non-endemic countries, including USA, Canada, Spain, Australia and Japan, where parasite transmission can occur, especially for organ transplantation and transfusion of contaminated

blood, since the practice of screening for *Trypanosoma cruzi* in blood and organ banks is not common in these countries [2]. It is estimated that in the United States alone there are about 300 thousand infected individuals, and a recent study suggests that a cycle of transmission of *Trypanosoma cruzi* is occurring locally [3]. Chagas disease begins when an individual becomes infected with *Trypanosoma cruzi*. Transmission by vector occurs when triatomines deposit infected faeces near the site of the bite, the bite of which compromises the physical integrity of the skin. The bite induces an inflammatory reaction that causes itching so that when the individual scratches the site of the bite the contaminated faeces are spread to the bite, allowing the parasite to penetrate the bite lesion (or the parasites can be spread to the mucous membranes, such as the eyes, where the parasites can easily enter).

The transmission form of the parasite is called the trypomastigote, and is capable of infecting various cells in the host organism. Once inside the cells the trypomastigotes differentiate into amastigotes, which are intracellular forms that are able to multiply. After a few days, the amastigotes differentiate into trypomastigotes and disrupt the host cell by moving in a tumbling fashion, they then go on to infect new cells, thus establishing the infection in the host.

The initial period of infection (acute phase) is characterized by non-specific symptoms such as fever, and diagnosis often fails due

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: luciofreitasjunior@gmail.com (L.H. Freitas-Junior), hstefani@usp.br (H.A. Stefani).

¹ Present address: Instituto Butantã, São Paulo, SP, Brazil.

Anexo XI:

Daniel G. Silva, Jean F.R. Ribeiro, Daniela De Vita, Lorenzo Cianni, Caio Haddad Franco, Lucio H. Freitas-Junior, Carolina Borsoi Moraes, Josmar R. Rocha, Antonio C.B. Burtoloso, Peter W. Kenny, Andrei Leitão and Carlos A. Montanari. **A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, 2017.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 27 (2017) 5031–5035



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



A comparative study of warheads for design of cysteine protease inhibitors



Daniel G. Silva^a, Jean F.R. Ribeiro^a, Daniela De Vita^a, Lorenzo Cianni^a, Caio Haddad Franco^b, Lucio H. Freitas-Junior^{b,1}, Carolina Borsoi Moraes^{b,1}, Josmar R. Rocha^a, Antonio C.B. Burtoloso^c, Peter W. Kenny^{a,*}, Andrei Leitão^{a,*}, Carlos A. Montanari^{a,*}

^a Grupo de Química Medicinal do IQSC/USP, Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil

^b Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, São Paulo, Brazil

^c Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 August 2017

Revised 28 September 2017

Accepted 1 October 2017

Available online 3 October 2017

Keywords:

Aldehyde
Covalent inhibitor
Cysteine protease
Nitrile
Oxime
Warhead

ABSTRACT

The effects on potency of cruzain inhibition of replacing a nitrile group with alternative warheads were explored. The oxime was almost an order of magnitude more potent than the corresponding nitrile and has the potential to provide access to the prime side of the catalytic site. Dipeptide aldehydes and azadipeptide nitriles were found to be two orders of magnitude more potent cruzain inhibitors than the corresponding dipeptide nitriles although potency differences were modulated by substitution at P1 and P3. Replacement of the α methylene of a dipeptide aldehyde with cyclopropane led to a loss of potency of almost three orders of magnitude. The vinyl esters and amides that were characterized as reversible inhibitors were less potent than the corresponding nitrile by between one and two orders of magnitude.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Cysteine proteases have been linked to a range of human diseases.^{1–4} In particular, members of this target class are seen as potential targets for therapeutic intervention in the treatment of parasitic diseases such as Chagas disease,⁵ African sleeping sickness⁶ and leishmaniasis.⁷ A commonly employed tactic in design of cysteine protease inhibitors is to incorporate an electrophilic moiety that can form a covalent bond between the catalytic cysteine and the inhibitor.^{3,4,6–13} These functional groups are commonly termed 'warheads' and the electrophilic center is typically an unsaturated carbon atom. Formation of a covalent bond between inhibitor and enzyme allows the cysteine thiol to be exploited as a molecular recognition element even when the asso-

ciated part of the protein molecular surface is suboptimal for formation of non-covalent interactions.¹⁰ For example, the molecular surface associated with the catalytic thiol of a cysteine protease is typically saddle-shaped (i.e. concave in one direction but convex in another).¹¹ The nitrile group^{3,11–14} is considered to be a particularly useful warhead for cysteine protease inhibition on account of its metabolic stability, polarity and small contribution to molecular size.

Although covalent binding to proteins is often believed to be irreversible, this does not have to be the case. While reversibility of binding may reduce the risk of adverse effects, irreversible binding can result in prolonged duration of action.^{3,9,10} Selectivity can be achieved¹⁵ with irreversible inhibitors but irreversibility to the extent that a drug remains covalently bound to peptide fragments after protein degradation is generally undesirable because it can lead to immunogenicity.¹¹ The functional behavior of warheads is sometimes assumed to be determined entirely by electrophilicity although atoms bonded to the electrophilic center can form non-covalent interactions with target proteins that also modulate affinity. Examples of these non-covalent interactions are shown in Fig. 1 for inhibitors based on nitrile¹⁶ and α -ketoamide¹⁷ warheads. Fig. 1 also illustrates how a 1,2-dicarbonyl

Abbreviations: Boc, *tert*-butoxy carbonyl; Cbz, carboxybenzyl; CC₅₀, half maximal cytotoxicity concentration; EC₅₀, half maximal effective concentration; EDC, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride; IBX, 2-iodoxybenzoic acid; K_i, inhibitory constant; pCC₅₀, $-\log_{10}(\text{CC}_{50}/\text{M})$; pEC₅₀, $-\log_{10}(\text{EC}_{50}/\text{M})$; pK_i, $-\log_{10}(\text{K}_i/\text{M})$; SAR, structure activity relationship; ΔpK_i , change in pK_i resulting from a structural transformation.

* Corresponding authors.

E-mail addresses: pwk.pub.2008@gmail.com (P.W. Kenny), andleitao@iqsc.usp.br (A. Leitão), carlos.montanari@usp.br (C.A. Montanari).

¹ Present address: Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo & Instituto Butantan, São Paulo – SP, Brazil.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2017.10.002>

0960-894X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Anexo XII:

Fanny Palace-Berl, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto, Bianca Zingales, Carolina Borsoi Moraes, Mariana Bury, Caio Haddad Franco, Adelson Lopes da Silva Neto, João Sussumu Murayama, Solange Lessa Nunes, Marcelo Nunes Silva, Leoberto Costa Tavares. **Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofurán-2-yl) methylene] substituted hydrazides against *Trypanosoma cruzi* to design novel active compounds.** European Journal of Medicinal Chemistry, 2018.

European Journal of Medicinal Chemistry 144 (2018) 29–40



Contents lists available at ScienceDirect

European Journal of Medicinal Chemistry

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/ejmech>



Research paper

Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofurán-2-yl) methylene] substituted hydrazides against *Trypanosoma cruzi* to design novel active compounds



Fanny Palace-Berl ^{a,*}, Kerly Fernanda Mesquita Pasqualoto ^b, Bianca Zingales ^c, Carolina Borsoi Moraes ^d, Mariana Bury ^c, Caio Haddad Franco ^d, Adelson Lopes da Silva Neto ^a, João Sussumu Murayama ^a, Solange Lessa Nunes ^c, Marcelo Nunes Silva ^c, Leoberto Costa Tavares ^a

^a Department of Biochemical and Pharmaceutical Technology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, SP, Brazil

^b Innovation and Industrial Development Laboratory, Butantan Institute, SP, Brazil

^c Department of Biochemistry, Chemistry Institute, University of São Paulo, SP, Brazil

^d Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 August 2017

Received in revised form

29 November 2017

Accepted 2 December 2017

Available online 5 December 2017

Keywords:

Nitrofurans

Trypanosoma cruzi

Amastigote intracellular forms

Exploratory data analysis

Chemometric approaches

Chagas disease

Structure-activity relationships

ABSTRACT

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is a neglected chronic tropical infection endemic in Latin America. New and effective treatments are urgently needed because the two available drugs - benznidazole (BZD) and nifurtimox (NFX) - have limited curative power in the chronic phase of the disease. We have previously reported the design and synthesis of N'-[(5-nitrofurán-2-yl) methylene] substituted hydrazides that showed high trypanocidal activity against axenic epimastigote forms of three *T. cruzi* strains. Here we show that these compounds are also active against a BZD- and NFX-resistant strain. Herein, multivariate approaches (hierarchical cluster analysis and principal component analysis) were applied to a set of thirty-six formerly characterized compounds. Based on the findings from exploratory data analysis, novel compounds were designed and synthesized. These compounds showed two- to three-fold higher trypanocidal activity against epimastigote forms than the previous set and were 25–30-fold more active than BZD. Their activity was also evaluated against intracellular amastigotes by high content screening (HCS). The most active compounds (BSF-38 to BSF-40) showed a selective index (SI') greater than 200, in contrast to the SI' values of reference drugs (NFX, 16.45; BZD, > 3), and a 70-fold greater activity than BZD. These findings indicate that nitrofurán compounds designed based on the activity against epimastigote forms show promising trypanocidal activity against intracellular amastigotes, which correspond to the predominant parasite stage in the chronic phase of Chagas disease.

© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Chagas disease (CD) is a potentially life-threatening illness to around eight million infected people in 21 Latin American countries. The disease is emergent in non-endemic countries introduced by extensive global migrations and perpetuated by means of congenital transmission [1].

The protozoan *Trypanosoma cruzi*, which is the etiological agent

of CD, has three main developmental forms: the epimastigote, encountered in the gut of triatomine vectors and easily cultured in the laboratory; the trypomastigote, encountered in the blood of infected hosts and that has the capacity to invade mammalian cells; and the amastigote, which multiplies in the cytoplasm of infected cells. *T. cruzi* strains show a remarkable genotypic and phenotypic heterogeneity. At the present, the parasite strains are partitioned into six lineages or discrete typing units (DTUs), TcI–TcVI [2], which have distinct, but not exclusive ecological and epidemiological associations [3].

Current treatment options for CD are limited to two nitro-heterocyclic drugs: benznidazole (BZD) and nifurtimox (NFX). Although both drugs are quite effective in curing patients in the

* Corresponding author. Av. Prof. Lineu Prestes, 580, São Paulo, SP 05508-000, Brazil.

E-mail addresses: palaceberlf@usp.br, fanny.palace@gmail.com (F. Palace-Berl).

Anexo XIII:

Tiago R. Silva, Alysso W. F. Duarte, Michel R. Z. Passarini, Ana Lucia T. G. Ruiz, Caio Haddad Franco, Carolina Borsoi Moraes, Itamar Soares de Melo, Rodney A. Rodrigues, Fabiana Fantinatti-Garboggini, Valéria Maia Oliveira. **Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities.** Polar Biology, 2018.

Polar Biology
<https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y>

ORIGINAL PAPER



Bacteria from Antarctic environments: diversity and detection of antimicrobial, antiproliferative, and antiparasitic activities

Tiago R. Silva^{1,2} · Alysso W. F. Duarte³ · Michel R. Z. Passarini⁴ · Ana Lucia T. G. Ruiz⁵ · Caio Haddad Franco⁷ · Carolina Borsoi Moraes⁷ · Itamar Soares de Melo⁸ · Rodney A. Rodrigues⁶ · Fabiana Fantinatti-Garboggini² · Valéria Maia Oliveira²

Received: 24 May 2017 / Revised: 1 March 2018 / Accepted: 2 March 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Microorganisms dominate most of Antarctic ecosystems and play a crucial role in their functioning. They are called extremophilic microorganisms with unique and versatile metabolic properties with possible biotechnological applications in several areas. The aim of the present study was to identify psychrotolerant microorganisms from Antarctic continent samples and to screen them for antimicrobial effects. Phylogenetic analyses revealed that most isolates were closely related to recognized species, including those recovered previously from Antarctica, which belonged to the major phyla Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, and Proteobacteria (classes Alpha, Beta, and Gammaproteobacteria). A total of 326 bacterial isolates, distributed in 39 different genera, were recovered and identified based on sequencing of the 16S rRNA gene. The main representative genera were *Arthrobacter*, *Psychrobacter*, *Pseudoalteromonas*, and *Rhodococcus*. Antimicrobial screening revealed fifteen isolates capable of inhibiting growth of at least one of the indicator strains: *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, and *Candida albicans*. One psychrotolerant bacterium, *Pseudomonas* sp. isolate 99, showed a broad antimicrobial range, in addition to antiproliferative and antiparasitic activity. Overall, the small number of antibiotic-producing isolates obtained and the weakness of their inhibition halos corroborated previous findings suggesting that cold-loving bacteria from Antarctica are not as good as their relatives from mesophilic environments for antimicrobial prospecting. Nonetheless, antiproliferative and antiparasitic results observed are promising and suggest that there is an untapped wealth in Antarctic environments for bioprospecting compounds with pharmaceutical potential application.

Keywords Bioprospecting · Bioactive compounds · Cold environments · 16S rRNA genes · *Pseudomonas*

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00300-018-2300-y>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Valéria Maia Oliveira
vmaia@cpqba.unicamp.br

Tiago R. Silva
tiago04@gmail.com

¹ Institute of Biology, Campinas State University, P.O.Box: 6109, Campinas, SP, Brazil

² Division of Microbial Resources, Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA), Campinas State University, Campinas, Brazil

³ Federal University of Alagoas (UFAL), Alagoas, Brazil

⁴ Federal University for Latin American Integration, Foz do Iguaçu, Brazil

⁵ Division of Pharmacology and Toxicology, Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA), Campinas State University, Campinas, Brazil

⁶ Division of Natural Products Chemistry, Chemical, Biological and Agricultural Pluridisciplinary Research Center (CPQBA), Campinas State University, Campinas, Brazil

⁷ Brazilian Biosciences National Laboratory, National Center for Research IN Energy and Materials (CNPEM), Campinas, Brazil

⁸ Environmental Microbiology Laboratory (EMBRAPA), Jaguariuna, Brazil

Anexo XIV:

Fabricio Castro Machado, Caio Haddad Franco, Jose Vitorino dos Santos Neto, Karina Luiza Dias-Teixeira, Carolina Borsoi Moraes, Ulisses Gazos Lopes, Bertal Huseyin Aktas, Sergio Schenkman **Identification of di-substituted ureas that prevent growth of trypanosomes through inhibition of translation initiation**. Scientific Reports, 2018.

www.nature.com/scientificreports

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN

Identification of di-substituted ureas that prevent growth of trypanosomes through inhibition of translation initiation

Received: 20 October 2017
Accepted: 8 March 2018
Published online: 20 March 2018

Fabricio Castro Machado¹, Caio Haddad Franco^{1,3}, Jose Vitorino dos Santos Neto², Karina Luiza Dias-Teixeira², Carolina Borsoi Moraes^{3,4}, Ulisses Gazos Lopes², Bertal Huseyin Aktas⁵ & Sergio Schenkman¹

Some 1,3-diarylureas and 1-((1,4-*trans*)-4-aryloxycyclohexyl)-3-arylureas (cHAUs) activate heme-regulated kinase causing protein synthesis inhibition via phosphorylation of the eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF2) in mammalian cancer cells. To evaluate if these agents have potential to inhibit trypanosome multiplication by also affecting the phosphorylation of eIF2 alpha subunit (eIF2 α), we tested 25 analogs of 1,3-diarylureas and cHAUs against *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease. One of them (I-17) presented selectivity close to 10-fold against the insect replicative forms and also inhibited the multiplication of *T. cruzi* inside mammalian cells with an EC₅₀ of 1–3 μ M and a selectivity of 17-fold. I-17 also prevented replication of African trypanosomes (*Trypanosoma brucei* bloodstream and procyclic forms) at similar doses. It caused changes in the *T. cruzi* morphology, arrested parasite cell cycle in G1 phase, and promoted phosphorylation of eIF2 α with a robust decrease in ribosome association with mRNA. The activity against *T. brucei* also implicates eIF2 α phosphorylation, as replacement of WT-eIF2 α with a non-phosphorylatable eIF2 α , or knocking down eIF2 protein kinase-3 by RNAi increased resistance to I-17. Therefore, we demonstrate that eIF2 α phosphorylation can be engaged to develop trypanosome-static agents in general, and particularly by interfering with activity of eIF2 kinases.

Parasitic diseases caused by protozoa such as Chagas disease and African Trypanosomiasis still lack effective, safe, and highly accessible chemotherapy^{1–4}. The available drugs are toxic, the treatments show a high degree of abandon due to aggressive side effects⁵ and resistance has been detected⁶. Currently, very few compounds are on clinical trials for Chagas disease and African Trypanosomiasis caused respectively by *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*^{7,8}.

Different approaches have been devised to identify new compounds to treat these diseases. Previous works have explored unique trypanosome biological processes to find new drug targets. Examples are studies targeting cysteine proteases, farnesyl pyrophosphatase synthase, glyceraldehyde 3-phosphate-dehydrogenase, 14 α -demethylase and trans-sialidases^{9–11}. The enzyme 14 α -demethylase has gathered attention due to its essential role in biosynthesis of steroids. This enzyme is inhibited by azolic compounds originally developed as antifungal agents, which were subsequently repurposed for treatment of Chagas disease^{12,13}. Although, the treatment with a 14 α -demethylase inhibitor, called posaconazole, has shown promising results, this treatment did not eliminate the parasite in most cases, probably due to differences in parasite strains^{14,15} and prompted combinatory therapies¹⁶.

¹Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 04039-032, São Paulo, SP, Brazil. ²Laboratório de Parasitologia Molecular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil. ⁴Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil. ⁵Hematology Laboratory for Translational Research, Department of Medicine, Brigham and Women's Hospital and Harvard Medical School, 75 Francis Street, Boston, MA, 02115, United States. Correspondence and requests for materials should be addressed to B.H.A. (email: huseyin_aktas@hms.harvard.edu) or S.S. (email: sschenkman@unifesp.br)