

MARIANA BURY DA SILVA SANTOS

**Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de derivados do 5-nitrofurano e
algumas características de seu modo de ação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2018

MARIANA BURY DA SILVA SANTOS

**Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de derivados do 5-nitrofurano e
algumas características de seu modo de ação**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales

Versão Corrigida

São Paulo
2018

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Bury da Silva Santos, Mariana

Atividade anti-Trypanosoma cruzi de derivados do 5-nitrofurano e algumas características de seu modo de ação / Mariana Bury da Silva Santos; orientador Bianca Silvana Zingales. -- São Paulo, 2018.
115 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Derivados de Nifuroxazida. 2. Efeito tripanocida. 3. Ativação por nitroredutase mitocondrial. 4. Entrada por difusão passiva. 5. Quebras no DNA. I. Zingales, Bianca Silvana, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Mariana Bury da Silva Santos

Título da Dissertação: Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de derivados do 5-nitrofurano e algumas características de seu modo de ação.

Orientadora: Profa. Dra. Bianca Silvana Zingales

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a **27/06/2018**, considerou a candidata:

() **Aprovada** () **Reprovada**

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Carlos Renato Machado
Instituição: Universidade Federal de Minas Gerais

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Graziella Eliza Ronsein
Instituição: Universidade de São Paulo

Examinador(a): Assinatura:
Nome: Alejandro Miguel Katzin
Instituição: Universidade de São Paulo

Presidente: Assinatura:
Nome: Bianca Silvana Zingales
Instituição: Universidade de São Paulo



Cidade Universitária "Armando de Sales Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº **763/15** referente ao projeto intitulado: "*Modo de ação de derivados da Nifuroxazida com atividade anti-Trypanosoma cruzi: envolvimento de stress oxidativo?*" sob a responsabilidade de **Mariana Bury da Silva Santos**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Bianca Silvana Zingales**, do IQ-USP, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPESH- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 31 de agosto de 2015.

PROF. DR. ANDERSON DE SÁ NUNES
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M. A. ZANOTTO
Coordenador da CEPESH - ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus pais, Valmir e Arlete, por todo o amor e incentivo que sempre me foram dados.

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos:

À Professora Bianca Zingales, que me acolheu em seu laboratório, me proporcionou oportunidades incríveis de crescimento, tanto no âmbito profissional quanto pessoal, ao longo desses 5 anos em que estive sob sua orientação; pela paciência, ajuda e por seus ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular de Tripanossomatídeos, Marcelo Nunes, Solange Lessa Nunes e Pamela Petravicius, por serem muito mais do que colegas de laboratório, por todo o apoio, pela motivação, pelas conversas sinceras, pela ajuda nos experimentos e pela amizade que levaremos para sempre.

Ao Prof. Leoberto Costa Tavares, chefe do Laboratório de Planejamento e Desenvolvimento de Fármacos, da FCF-USP, pela colaboração na realização deste trabalho e fornecimento dos compostos utilizados; ao técnico João Sussumo Murayama, por toda a assistência prestada; e especialmente à Fanny Palace-Berl, por toda a ajuda em inúmeras situações, pela amizade e parceria e por tudo que me ensinou.

À Professora Alícia Kowaltowski, chefe do Laboratório de Metabolismo Energético do IQ-USP, pela disponibilização do Oxígrafo, do Espectrofluorímetro e dos reagentes; aos alunos Bruno Chausse e Sérgio de Menezes Filho, e especialmente à técnica Camille Caldeira, por todo o suporte na realização dos ensaios.

À Professora Iolanda Midea Cuccovia, chefe do Laboratório de Sistemas Biomiméticos do IQ-USP, pela disponibilização do Espectrofotômetro; à técnica Marcia Aparecida da Silva, à Laura Farkuh, e ao Dr. Filipe da Silva Lima (UFPE), pelas dicas e pela ajuda na realização dos ensaios.

Ao Professor Fábio Luis Forti e seus alunos do Laboratório de Sinalização em Sistemas Biomoleculares, Lilian Russo, Yuli Thamires Magalhães, Lucas Falcão Monteiro, Jessica Oliveira Farias e Luiz Eduardo da Silva, por termos compartilhado materiais, cafés, almoços, risadas e angústias.

À Professora Ohara Augusto, e a todos os membros do Laboratório de Bioquímica de Oxidantes & Radicais Livres & EPR do IQ-USP pelos reagentes emprestados.

À Silvia Ferreira Camargo, secretária da Pós-Graduação do ICB-USP pela atenção e solicitude.

Aos meus pais Arlete e Valmir, por serem meus grandes exemplos de vida e por me darem todo o apoio de que precisei; à minha avó Anna Maria, a meus irmãos Gabriel e Guilherme, à toda a minha família, por ser minha base e por inúmeras razões que palavras não seriam capazes de descrever.

Ao João Pedro Lago, por todo o apoio desde o início, pelas palavras de incentivo, por me fazer acreditar em mim mesma e nunca me deixar desistir; pelas caronas, pelas risadas, pelo amor, carinho e atenção.

Ao Marcelo Vasconcelos, por me escutar sem julgar, por me mostrar novas maneiras de ver a vida e lidar com obstáculos e frustrações. Pelas injeções de ânimo e por me ajudar a enxergar coisas que eu não queria ver, principalmente sobre mim mesma. *“Nós poderíamos ser muito melhores se não quiséssemos ser tão bons”* - Sigmund Freud.

Aos amigos que sempre torceram por mim e me incentivaram ao longo dessa jornada.

À Alexandra Elbakyan, por remover as barreiras no caminho da ciência, lutando pelo livre acesso universal aos estudos científicos.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro e pela bolsa de estudos, essencial para a realização deste trabalho.

A todos que direta e indiretamente tornaram este trabalho possível, minha gratidão.

*“O que vale na vida não é o ponto de partida
e sim a caminhada. Caminhando e semeando,
no fim terás o que colher.”*

(Cora Coralina)

RESUMO

SANTOS, M. B. S. **Atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de derivados do 5-nitrofurano e algumas características de seu modo de ação**. 2018. 115 f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

A busca de novos compostos para o tratamento da doença de Chagas é uma prioridade de pesquisa. Neste estudo, investigamos a atividade de derivados do 5-nitrofurano, cuja síntese se baseou em modificações moleculares do fármaco Nifuroxazida (NF), sobre formas epimastigotas das cepas Silvio X10 c11 e Colombiana de *Trypanosoma cruzi*, ambas isoladas de casos humanos e pertencentes à DTU TcI. A cepa Colombiana foi escolhida por apresentar resistência a Benznidazol (BZ) e a Nifurtimox (NFX), únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas. Inicialmente investigamos a influência da composição do meio de cultura na atividade de dois derivados de NF, um com comprovada atividade anti-*T. cruzi* e outro inativo. Utilizando duas formulações do meio LIT e o meio Grace, verificamos que nos três meios a atividade diferencial dos compostos se mantém. Para o composto com atividade tripanocida, os valores de CI_{50} nos meios LIT não apresentam diferenças consideráveis. No entanto, no meio Grace a sensibilidade das cepas foi 30% maior. Avaliamos o efeito de sete derivados de NF, usando como controles BZ e NFX. Verificamos que todos os derivados apresentam atividade tripanocida maior que BZ e quatro deles, maior que NFX. Concluímos não haver diferenças de sensibilidade nas duas cepas analisadas. Os derivados apresentam baixa citotoxicidade para as células LLC-MK₂. Verificamos que alguns derivados de NF promovem a mortalidade de ~99% dos tripomastigotas, após incubação por 20 h a 37 °C, ao passo que a mortalidade provocada por NFX, no mesmo período de observação, é de apenas 7,3 %. Outro objetivo contemplado em nosso projeto foi o de determinar algumas características relacionadas ao modo de ação de cinco derivados de NF, um com baixa (c1) e os demais com elevada atividade tripanocida (c5, c15, c19 e c20), aferida a partir dos valores de CI_{50} . Os valores de ClogP indicam que os compostos c15, c19 e c20 são mais hidrofóbicos, tendo maior capacidade de atravessar membranas biológicas. A primeira característica investigada foi a capacidade de os derivados de NF serem ativados pela nitroredutase mitocondrial de tipo I de *T. cruzi* (*TcNTR*), de putativa origem bacteriana. Concluímos que a *TcNTR* é capaz de ativar *in vitro* os derivados de NF. Verificamos que a entrada dos compostos no parasito ocorre por difusão passiva ou por difusão facilitada mediada por receptor não dependente de ATP. Concluímos que o efeito tripanocida dos derivados não depende de um ciclo redox, uma vez que os compostos não promovem o aumento do consumo de oxigênio mitocondrial, nem induzem a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Além disto, nossos resultados apoiam observações anteriores que indicam que NFX não atuaria via ciclo redox. Demonstramos que os derivados de NF induzem extensas quebras no DNA, análogas àquelas produzidas por BZ.

Palavras-chave: Derivados de Nifuroxazida. Efeito tripanocida. Ativação por nitroredutase mitocondrial. Entrada por difusão passiva. Quebras no DNA.

ABSTRACT

SANTOS, M. B. S. **Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of 5-nitrofurán derivatives and some characteristics of their mode of action.** 2018. 115 f. Dissertation (MSc in Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

The search for new compounds for the treatment of Chagas disease is a research priority. In this study, we investigated the activity of 5-nitrofurán derivatives, whose synthesis was based on molecular modifications of the drug Nifuroxazide (NF), on epimastigote forms of the Silvio X10 c11 and Colombiana strains of *Trypanosoma cruzi*, both isolated from human cases and belonging to DTU TcI. The Colombiana strain was chosen because of its resistance to Benznidazole (BZ) and Nifurtimox (NFX), the only drugs available for the treatment of Chagas disease. We first investigated the influence of the composition of the culture medium on the activity of two NF derivatives, one with proven anti-*T. cruzi* activity and the other inactive. Using two formulations of the LIT medium and the Grace medium we found that in the three media the differential activity of the compounds is maintained. For the compound with trypanocidal activity, the IC₅₀ values in the LIT media show no significant differences. However, in the Grace medium the sensitivity of the strains was 30% higher. We evaluated the effect of seven NF derivatives, using BZ and NFX as controls. We found that all derivatives presented trypanocidal activity greater than BZ and four of them, greater than NFX. The two strains showed equal sensitivity to the compounds, which have low cytotoxicity for LLC-MK2 cells. We found that some NF derivatives promote ~99% mortality of trypomastigotes after 20 h incubation at 37 °C, whereas NFX mortality in the same observation period is only 7.3%. Another objective contemplated in our project was to determine some characteristics related to the mode of action of five NF derivatives, one with low (c1) and the other with high trypanocidal activity (c5, c15, c19 and c20). ClogP values indicated that compounds c15, c19 and c20 are more hydrophobic and would have the capacity of crossing biological membranes. The first investigated characteristic was the ability of the NF derivatives to be activated by the type I mitochondrial nitroreductase of *T. cruzi* (TcNTR), of putative bacterial origin. We conclude that TcNTR is capable of activating the NF derivatives *in vitro*. We verified that the entry of NF derivatives into the parasite occurs through passive diffusion or receptor-mediated facilitated diffusion, ATP-independent. We also conclude that the trypanocidal effect of the derivatives does not depend on a redox cycle, since the compounds do not promote the increase of mitochondrial oxygen consumption nor induce the production of hydrogen peroxide (H₂O₂). In addition, our results support previous observations that indicate that NFX would not act via redox cycle. We demonstrate that NF derivatives induce extensive DNA breaks, analogous to those produced by BZ.

Keywords: Nifuroxazide derivatives. Trypanocidal effect. Activation by mitochondrial nitroreductase. Entry by passive diffusion. DNA breaks.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
Figura 2 - Distribuição geográfica aproximada das DTUs de <i>T. cruzi</i> nos ciclos de transmissão silvestre (azul) e doméstico (vermelho).....	21
Figura 3 - Estruturas químicas dos quimioterápicos Benznidazol e Nifurtimox.....	22
Figura 4 – Redução de nitrofuranos por nitroreductase de tipo I (<i>TcNTR</i>).	23
Figura 5 - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos.....	25
Figura 6 - Triagem baseada em alvos.....	26
Figura 7 - Estruturas de derivados azólicos e do Fexinidazol.	31
Figura 8 - Estrutura da Amiodarona.....	32
Figura 9 - Estrutura molecular de SQ109.....	32
Figura 10 - Estrutura química do Nifurtimox, Nifuroxazida (composto protótipo) e esqueleto dos compostos planejados.	34
Figura 11 - Mapa dos plasmídeos utilizados para a expressão da <i>TcNTR</i>	42
Figura 12 - Aspecto da monocamada de células LLC-MK ₂ e da coloração do formazan formado no ensaio do MTT.....	49
Figura 13 – Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 11% das amostras do processo de purificação da <i>TcNTR</i>	54
Figura 14 - Espectro da absorção do NAD ⁺ e do NADH.	55
Figura 15 - Cinética da reação da NTR de <i>E. coli</i> com o análogo de NF c1.....	56
Figura 16 - Determinação dos parâmetros K _m e V _{máx} da <i>TcNTR</i> para o composto c5.	58
Figura 17 - Espectro de absorção dos compostos na concentração de 100 µM em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 + 1% DMSO.	60
Figura 18 - Espectro de absorção dos compostos na concentração de 50 µM em meio A/G + 1% DMSO.	61
Figura 19 - Espectro de absorção dos compostos na concentração de 50 µM em meio A/G + BSA com 1% DMSO final.	62
Figura 20 - Captação de NFX e de derivados de NF por 10 ⁸ formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 a 4 °C.....	64
Figura 21 - Captação de NFX e de derivados de NF por 10 ⁸ formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 a 28 °C.....	65
Figura 22 – Cinética de captação de NFX e de derivados de NF por 10 ⁸ formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 a 28 °C.....	66

Figura 23 - Esquema do ensaio em presença dos inibidores de ATP.....	68
Figura 24 - Efeito do NFX e dos derivados de NF sobre a atividade desidrogenásica total de formas epimastigotas.....	70
Figura 25 - Consumo de oxigênio por epimastigotas das cepas Colombiana e Silvio X10 c11 nos meios reacionais SRM e A/G.....	71
Figura 26 - Efeito dos inibidores da síntese de ATP no consumo de oxigênio por epimastigotas intactos da cepa Silvio X10 c11.	72
Figura 27 – Análise da integridade do DNA por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). (por 48 h a 28 °C).....	75
Figura 28 – Análise da integridade do DNA por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). (por 24 h (a) ou 48 h (b) a 28 °C).....	75
Figura 29 - Estrutura molecular de c15 e c19 e valores da captação por 10 ⁸ formas epimastigotas a 28 °C.....	82
Figura 30 - Modos de ação propostos para Benznidazol e Nifurtimox.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados (quantidade/L).....	37
Tabela 2 - Tempo de duplicação, em horas, das cepas Silvio X10 c11 e Colombiana.....	47
Tabela 3 – Efeito da composição dos meios na CI_{50} (μM) (média \pm d.p.) de derivados da NF.....	48
Tabela 4 – Atividade de derivados da NF contra formas epimastigotas da cepa Silvio.....	49
Tabela 5 – Citotoxicidade da azida sódica para células LLC-MK ₂	50
Tabela 6 – Efeito citotóxico de derivados de NF sobre o crescimento de células LLC-MK ₂	50
Tabela 7 – Citotoxicidade de derivados da NF para células LLC-MK ₂ e índice de Seletividade (IS).....	51
Tabela 8 – Atividade de derivados de NF sobre formas tripomastigotas da cepa Colombiana após incubação por 20 h.....	52
Tabela 9 – Características de derivados de NF analisados no estudo.....	53
Tabela 10 – Atividade específica da Nitroredutase de <i>E. coli</i>	56
Tabela 11 – Atividade específica da Nitroredutase de <i>T. cruzi</i> (<i>TcNTR</i>).....	57
Tabela 12 – Valores de $K_{m\ ap}$ e V_{max} da <i>TcNTR</i> para NFX e derivados da NF.....	58
Tabela 13 – Coeficiente de absorvidade molar (ϵ) em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0.....	60
Tabela 14 – Coeficiente de absorvidade molar (ϵ) em meio A/G + BSA + 1% DMSO.....	62
Tabela 15 - Estabilidade do NFX e BZ a 4 °C e 28 °C na ausência de parasitos.....	63
Tabela 16 - Estabilidade de derivados de NF a 4 °C e 28 °C na ausência de parasitos.....	64
Tabela 17 – Quantidade de NFX e de derivados de NF captados após 2 h de incubação.....	66
Tabela 18 – Concentração de epimastigotas ($\times 10^6/mL$).....	68
Tabela 19 – Efeito de inibidores da síntese de ATP na captação de compostos após incubação por 2 horas a 28 °C.....	69
Tabela 20 – Inibição do consumo de oxigênio de formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 por NFX e derivados de NF.....	72
Tabela 21 – Efeito de compostos na produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	74
Tabela 22 – Algumas características dos derivados de NF estudados.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
<i>a.e.</i>	Atividade específica
A/G	Meio A suplementado com glicose
Ap	Aparente
ATP	Adenosina trifosfato
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i> (demanda bioquímica de oxigênio)
BSA	Albumina sérica bovina
BZ	Benznidazol
CC ₅₀	Concentração citotóxica para metade das células
CI ₅₀	Concentração do composto que inibe 50% do crescimento da cultura
CLogP	Coefficiente de partição calculado
cm	Centímetros
CO ₂	Dióxido de carbono
CT	Controle
dG	2-deoxiglicose
DHFR	Di-hidrofolato redutase
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	<i>Drugs for Neglected Diseases initiative</i> (iniciativa Medicamentos para Doenças Negligenciadas)
d.p.	Desvio-padrão
DTU	<i>Discrete Typing Unit</i> (unidade discreta de tipagem)
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetra-acético
FMN	Mononucleotídeo de flavina
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HAT	<i>Human African Trypanosomiasis</i> (tripanosomíase africana humana)
HCl	Ácido clorídrico
HGPRT	Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase
HTS	<i>High throughput screening</i> (triagem de alta produtividade)
IC	Inibição do crescimento
IS	Índice de Seletividade
KCl	Cloreto de potássio
kDa	Kilodaltons
KH ₂ PO ₄	Di-hidrogenofosfato de potássio
K _m	Constante de Michaelis
L	Litros
LIT	<i>Liver infusion Tryptose</i> (infusão de fígado e triptose)
LIT-Hb	Meio LIT suplementado com hemoglobina
LIT-He	Meio LIT suplementado com hemina
mg	Miligramas
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio

Na ₂ HPO ₄	Fosfato de sódio dibásico
NaCl	Cloreto de sódio
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
NAD ⁺	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma oxidada)
NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (forma reduzida)
NADPH	Dinucleotídeo de andenina e nicotinamida fosfato (forma reduzida)
NF	Nifuroxazida
NFX	Nifurtimox
NaN ₃	Azida sódica
nm	Nanômetros
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
NTR	Nitroredutase
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ ⁻	Ânion superóxido
OH	Radical livre hidroxila
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	Pares de bases
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (Gel de eletroforese em campo pulsado)
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SAR	<i>Structure-activity relationship</i> (relação estrutura-atividade)
SDS	Lauril sulfato de sódio
seg	Segundos
SFB	Soro fetal bovino
TBE	Tris-borato-EDTA
<i>t.d.</i>	Tempo de duplicação
UV-Vis	Ultravioleta-visível
V ₀	Velocidade inicial
V _{máx}	Velocidade máxima
°C	Grau Celcius
%IC	Porcentagem de inibição do crescimento
ε	Coeficiente de absorvidade molar
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μm	Micrometros
μM	Micromolar
8-oxodGTP	Desoxiguanosina trifosfato oxidada

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	A doença de Chagas	18
1.2	O <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.3	O tratamento da doença de Chagas	21
1.3.1	<i>Benznidazol e Nifurtimox</i>	21
1.3.2	<i>Descoberta de novos fármacos e tratamentos para a doença de Chagas</i>	23
1.3.2.1	<i>Abordagem baseada em alvos</i>	25
1.3.2.2	<i>Abordagem de triagem fenotípica</i>	28
1.3.2.3	<i>Redirecionamento de fármacos (drug repurposing)</i>	29
1.3.3	<i>Derivados da Nifuroxazida (NF)</i>	33
2.	JUSTIFICATIVA	35
3.	OBJETIVOS	36
3.1	Objetivos específicos:	36
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Cepas de <i>T. cruzi</i> e meios de cultura	37
4.2	Atividade dos compostos sobre formas epimastigotas	37
4.3	Determinação da citotoxicidade para células LLC-MK₂	38
4.3.1	<i>Cultura de células LLC-MK₂</i>	38
4.3.2	<i>Determinação da citotoxicidade para células LLC-MK₂</i>	39
4.3.3	<i>Tratamento dos dados de citotoxicidade</i>	39
4.4	Avaliação da atividade de derivados de NF sobre formas tripomastigotas	40
4.5	Compostos escolhidos para o estudo	40
4.6	Ativação dos derivados da NF pela nitroredutase de tipo I	41
4.6.1	<i>Obtenção e purificação da nitroredutase de tipo I de <i>T. cruzi</i> (TcNTR)</i>	41
4.6.2	<i>Padronização das condições para monitorar a atividade da NTR</i>	42
4.6.3	<i>Atividade da nitroredutase de <i>T. cruzi</i> (TcNTR) sobre derivados de NF</i>	43
4.7	Determinação da cinética de captação dos compostos	43
4.7.1	<i>Espectro de absorção e coeficiente de absortividade molar dos compostos</i>	43
4.7.2	<i>Cinética de captação dos compostos por formas epimastigotas</i>	44
4.8	Efeito dos compostos sobre a atividade desidrogenásica do <i>T. cruzi</i>	44
4.9	Consumo de oxigênio	45

4.10	Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) mitocondrial.....	45
4.11	Efeito dos compostos sobre o DNA do <i>T. cruzi</i>	46
5.	RESULTADOS	47
5.1	Efeito da composição do meio de cultura na atividade de derivados de NF	47
5.2	Atividade de derivados de nf sobre formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	48
5.3	Determinação da citotoxicidade de derivados da NF	49
5.4	Avaliação da atividade tripanocida sobre as formas tripomastigotas de <i>T. cruzi</i>	51
5.5	Compostos escolhidos para o estudo	52
5.6	Ativação dos derivados da NF pela nitroredutase de tipo I.....	53
5.6.1	<i>Obtenção e purificação da nitroredutase de tipo I de T. cruzi</i>	53
5.6.2	<i>Padronização das condições para monitorar a atividade da NTR</i>	55
5.6.3	<i>Atividade da nitroredutase de T. cruzi (TcNTR) sobre derivados de NF</i>	57
5.7	Cinética de captação dos compostos	59
5.7.1	<i>Espectro de absorção e coeficiente de absortividade molar dos compostos</i>	59
5.7.2	<i>Cinética de captação dos compostos por formas epimastigotas</i>	63
5.7.2.1	<i>Estabilidade dos derivados de NF</i>	63
5.7.2.2	<i>Captação dos derivados de NF por formas epimastigotas em duas temperaturas de incubação</i>	64
5.7.2.3	<i>Captação dos derivados de NF por formas epimastigotas em presença de inibidores da síntese de ATP</i>	67
5.8	Efeito dos derivados de NF na atividade desidrogenásica	69
5.9	Efeito dos derivados de NF no consumo de oxigênio	70
5.9.1	<i>Comparação entre os meios reacionais SRM e A/G</i>	70
5.9.2	<i>Efeito de inibidores da síntese de ATP no consumo de oxigênio</i>	71
5.9.3	<i>Efeito dos derivados de NF no consumo de oxigênio</i>	72
5.10	Efeito dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mitocondrial	73
5.11	Efeito dos compostos sobre o DNA	74
6.	DISCUSSÃO	76
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO	95

1. INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, é uma infecção humana causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. A doença é endêmica em 21 países da América Latina, sendo a Bolívia o país com a maior carga da enfermidade. De acordo com estimativas da Organização Mundial de Saúde, o número de pessoas infectadas no mundo é em torno de 6 milhões, e mais de 7.000 mortes ocorrem anualmente (CHATELAIN, 2017). Estatísticas recentes indicam que a doença de Chagas é a principal causa de morte da população idosa no Brasil (revisto em CHATELAIN, 2015; ZINGALES, 2017).

A doença de Chagas é usualmente transmitida por insetos triatomíneos hematófagos, denominados popularmente “barbeiros”. Pode ser transmitida ainda por vias não vetoriais, tais como, transfusão sanguínea, congênita (de mãe para o filho), por via oral (ingestão de alimentos ou bebidas contaminadas) e por transplante de órgãos (PEREIRA et al., 2009; ALARCÓN DE NOYA et al., 2010; DIAS, AMATO NETO, 2011; SANCHEZ, RAMIREZ, 2013).

A doença de Chagas apresenta duas fases: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é assintomática na maior parte dos indivíduos. No entanto, se não tratada, 2 a 8% dos indivíduos podem vir a óbito. Nesta fase, a parasitemia é elevada e pode ser diagnosticada por exame microscópico do sangue, PCR ou por exames parasitológicos (xenodiagnóstico e hemocultura). Após a infecção, o sistema imune do indivíduo é ativado e sua resposta induz a redução da parasitemia, mas não a cura.

Passada a fase aguda, que pode durar de 1 a 2 meses, inicia-se a fase crônica. Cerca de 60 a 70% dos indivíduos não desenvolvem manifestações clínicas (forma indeterminada). Por outro lado, 30 a 40% dos pacientes irão desenvolver manifestações cardíacas (cardiomiopatia chagásica), digestivas (megacólon e/ou megaesôfago) e envolvimento cardiodigestivo (CHATELAIN, 2017).

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um parasito digenético, que tem insetos triatomíneos da família Reduviidae, subfamília Triatominae, como hospedeiros intermediários, e cerca de 150 espécies de mamíferos, como hospedeiros definitivos. O parasito apresenta três formas evolutivas distintas que são nomeadas de acordo com a posição do cinetoplasto em relação ao

núcleo e a disposição do flagelo: o epimastigota, forma flagelada, não infectante, que se multiplica no tubo digestivo do inseto; o tripomastigota, forma flagelada, infectante e não replicativa, presente no vetor e nos hospedeiros mamíferos; e o amastigota, forma com pequeno flagelo intracelular, possivelmente infectante, que se multiplica no interior da célula do mamífero.

O *T. cruzi* possui um ciclo biológico complexo (Figura 1). A forma infectante encontrada no inseto é denominada tripomastigota metacíclica e é liberada no momento da picada, junto com as fezes e urina. O parasito somente infecta o hospedeiro via mucosa ou ferimentos na pele. As formas tripomastigotas metacíclicas são altamente infectantes, podendo invadir macrófagos, fibroblastos e células epiteliais, entre outras. No interior das células, os tripomastigotas se transformam em amastigotas que se multiplicam por fissões binárias sucessivas. Os amastigotas vão se diferenciando em tripomastigotas que, após ruptura celular, podem atingir a corrente sanguínea e invadir diferentes tipos celulares ou serem ingeridos por um inseto triatomíneo durante o repasto sanguíneo. No vetor, transformam-se em epimastigotas que se multiplicam no tubo digestivo. Na porção terminal do aparato digestório, os epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, que estão aptos a contaminar outros hospedeiros (revisto em RASSI, DE REZENDE, 2012).

O *T. cruzi* tem sido denominado “complexo *cruzi*” em função de sua considerável diversidade genética. As populações de parasitos, denominadas cepas, são muito diversas, com diferentes genótipos e fenótipos. Nos últimos anos, com o desenvolvimento de técnicas avançadas de biologia molecular, novas informações estão sendo geradas sobre a genética das populações do parasito. Em 2009, um Comitê de Expertos recomendou que o táxon *T. cruzi* fosse dividido em seis grupos (*T. cruzi* I-VI) (ZINGALES et al., 2009). Cada grupo corresponde a uma unidade discreta de tipagem (DTU, “*discrete typing unit*”), onde a DTU é definida como um conjunto de isolados identificado por marcadores moleculares comuns (TIBAYRENC, 1998). Mais recentemente, populações de parasitos restritas a morcegos foram consideradas a sétima DTU, denominada Tcbat (LIMA et al., 2015)

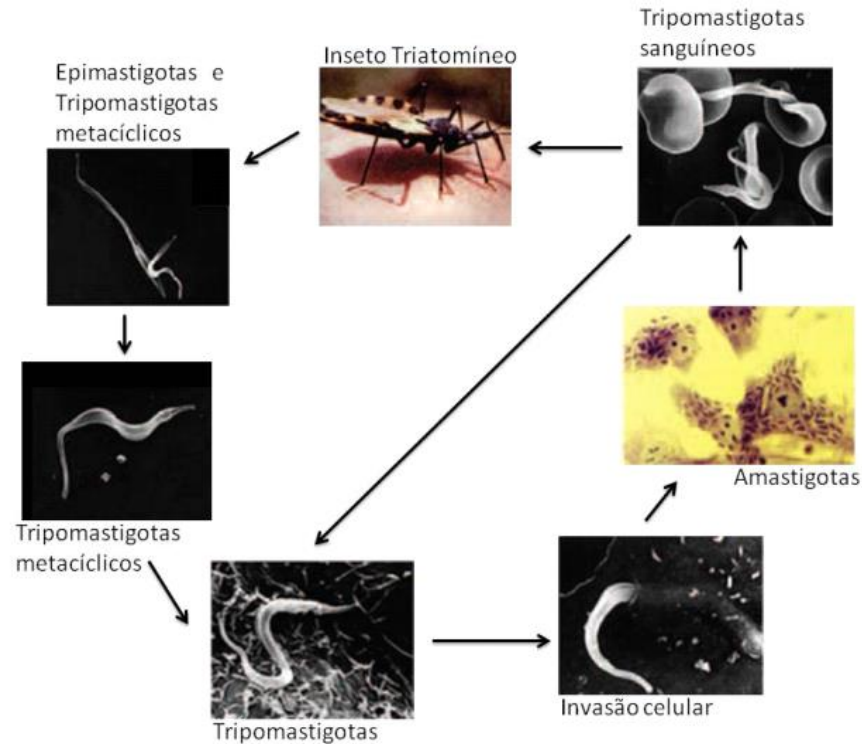


Figura 1 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. Epimastigotas e principalmente tripomastigotas metacíclicos são liberados pelo inseto vetor durante a defecação. Após entrarem por uma ferida na pele ou atravessar uma membrana mucosa, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células hospedeiras. Intracelularmente, os parasitas saem do vacúolo parasitóforo derivado do lisossomo e se replicam no citoplasma como amastigotas. No final do ciclo de replicação, amastigotas diferenciam-se em tripomastigotas, que são liberados na corrente sanguínea e podem infectar novas células ou serem ingeridos pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo. (Adaptado de ANDRADE, ANDREWS, 2005).

Graças ao desenvolvimento de esquemas simples de tipagem molecular (revisto em ZINGALES et al., 2012), que podem ser praticados em laboratórios de países de doença endêmica, foi possível estabelecer a distribuição geográfica e eco-epidemiológica das DTUs TcI a TcVI (Figura 2).

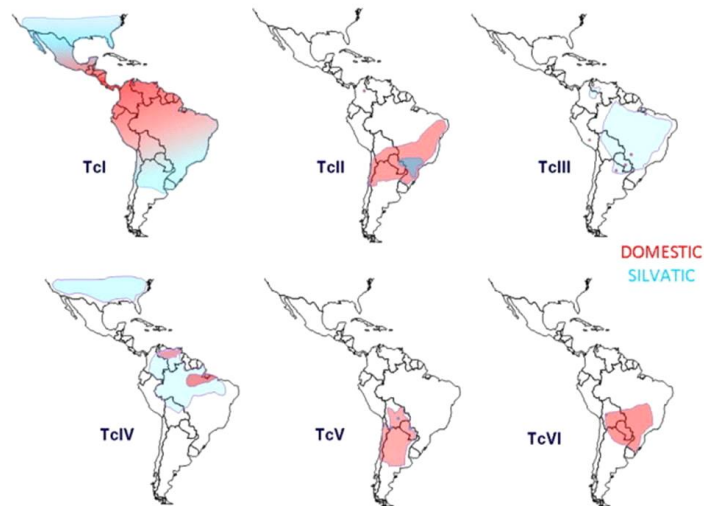


Figura 2 - Distribuição geográfica aproximada das DTUs de *T. cruzi* nos ciclos de transmissão silvestre (azul) e doméstico (vermelho). Extraído de ZINGALES et al., 2012.

As DTUs apresentam associações distintas com os ciclos silvestre e doméstico, mas não exclusivas. No que se refere à doença de Chagas humana, TcI é prevalente em pacientes da Amazônia, países Andinos e da América Central e no México. As apresentações clínicas de TcI incluem cardiomiopatias severas. Nos países do Cone Sul, as DTUs TcII, TcV e TcVI são as principais responsáveis pela doença de Chagas. TcII predomina no Brasil central e no leste do país; TcV na Argentina, Bolívia e Paraguai, e TcVI na região do Grão Chaco (revisto em ZINGALES et al., 2012). No Cone Sul, a cardiomiopatia chagásica pode ser severa, e alguns indivíduos podem desenvolver as formas digestivas. Estas formas são raras no norte da América do Sul, América Central e México.

1.3 O tratamento da doença de Chagas

1.3.1 *Benznidazol e Nifurtimox*

As opções de tratamento da doença de Chagas estão limitadas a dois fármacos nitroheterocíclicos: Benznidazol (BZ) (Rochagan/LAFEPE e Abarax/ELEA e Rodanil/ROCHE) e Nifurtimox (NFX) (LAMPIT/Bayer) (Figura 3). Ambos os medicamentos apresentam efeitos colaterais, que podem determinar a interrupção do tratamento. Os efeitos colaterais incluem dermatite alérgica, prurido, febre e intolerância gastrointestinal, entre outros. Outros fatores críticos para o uso do NFX e BZ são a baixa taxa de cura no tratamento da doença crônica (de 20 a 30% de cura parasitológica) e a longa duração do tratamento (60

dias para BZ e 90 a 120 dias para NFX). BZ é considerado o tratamento de primeira linha, enquanto NFX está reservado para aqueles pacientes que não toleram o BZ (RASSI et al., 2012).

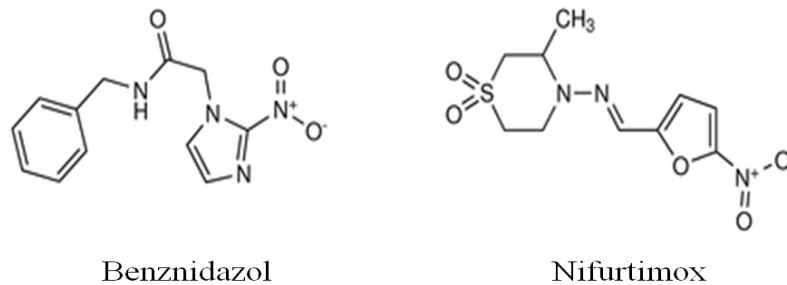


Figura 3 - Estruturas químicas dos quimioterápicos Benznidazol e Nifurtimox

NFX e BZ são pró-fármacos que necessitam ser ativados por nitroredutases do parasito para exercer os efeitos tripanocidas. Duas classes de nitroredutases (NTR), de tipo I e de tipo II, podem catalisar a redução do grupo nitro ligado ao anel aromático do fármaco (revisto em PATTERSON, WYLLIE, 2014). Estudos *in vitro* demonstram que uma NTR mitocondrial do tipo I (*Tc*NTR) é capaz de ativar BZ, NFX e outros fármacos nitroheterocíclicos, tais como nitrofurazona e megazol (WILKINSON et al., 2008). Além disto, a importância desta enzima na resistência a esses fármacos tem sido validada pela supressão do gene correspondente (WILKINSON et al., 2008).

A *Tc*NTR catalisa a redução de dois elétrons do NFX ou BZ, formando um intermediário nitroso. Em seguida, a enzima promove uma segunda redução de dois elétrons para gerar uma hidroxilamina, utilizando NAD(P)H como coenzima (WILKINSON et al., 2008; HALL, BOT, WILKINSON, 2011; WILKINSON et al., 2011; PATTERSON, WYLLIE, 2014). A hidroxilamina pode ser metabolizada por várias vias: (i) formação de um íon nitrênio; (ii) redução para a forma amina; ou (iii) clivagem do anel furano, com formação de nitrilas saturadas e insaturadas de cadeia aberta. Estas últimas poderiam reagir de modo inespecífico com uma gama de componentes celulares. Isto explicaria os efeitos pleiotrópicos do NFX nos tripanossomas, em que o tratamento com este fármaco inibe uma série de atividades enzimáticas, modifica os níveis de tióis e causa dano ao DNA (revisto em HALL et al., 2011). Na Figura 4 apresentamos um dos mecanismo de redução de nitrofuranos proposto para a *Tc*NTR.

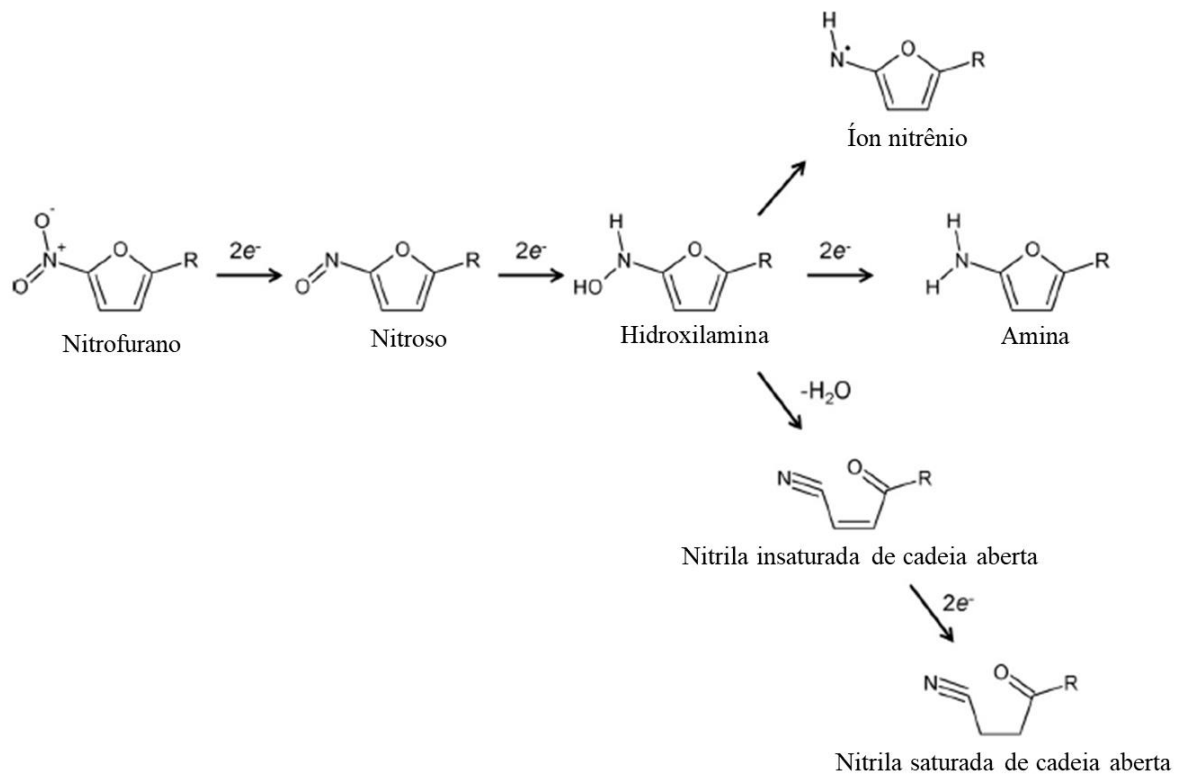


Figura 4 – Redução de nitrofuranos por nitroreductase de tipo I (*TcNTR*). Extraído de HALL et al., 2011.

Para as NTRs de tipo II propõe-se a redução de 1 elétron do grupo nitro dos compostos aromáticos, originando um radical nitro instável. Na presença de oxigênio, este determina a formação de superóxido e a regeneração do pró-fármaco, num processo conhecido como ciclo redox (“*redox cycling*”) (ver Discussão). A enzima superóxido dismutase atua sobre o íon superóxido gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, via reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe (III), forma o radical hidroxila. A esta espécie tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolvem ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA do *T. cruzi* (WILKINSON et al., 2008; WILKINSON et al., 2011; PATTERSON, WYLLIE 2014).

1.3.2 Descoberta de novos fármacos e tratamentos para a doença de Chagas

Conforme comentado acima, BZ e NFX apresentam baixa eficácia na fase crônica da doença de Chagas, além de necessitarem de um tratamento prolongado e terem efeitos colaterais indesejáveis. O conjunto de aspectos negativos determina a necessidade da busca de novos tratamentos para esta doença.

A doença de Chagas integra o conjunto de Doenças Tropicais Negligenciadas. Estas são doenças parasitárias e bacterianas que prevalecem em regiões tropicais e subtropicais, afetam mais de um bilhão de pessoas que vivem em condição de pobreza e causam cerca de um milhão de mortes anuais. São exemplos: malária, doença de Chagas, leishmaniose, doença do sono, hanseníase e esquistossomose. Essas doenças são denominadas negligenciadas pois os governos dos países onde são endêmicas, por restrições econômicas, decidiram deixar na mão das indústrias farmacêuticas o desenvolvimento e a produção de fármacos para o seu tratamento. As indústrias, por sua vez, não têm interesse em tais atividades, pois o retorno financeiro é muito baixo. Países desenvolvidos também não têm interesse em investir em pesquisa nestas doenças, uma vez que, raramente, estas afetam sua população. Como exemplo do que foi dito acima, menciona-se que, no período de 2000 a 2011, foram aprovados 850 medicamentos (novas indicações, novas formulações, combinações de doses fixas, vacinas e produtos biológicos), sendo que destes, apenas 37 (4%) foram destinados às doenças negligenciadas (PEDRIQUE et al., 2013).

O tempo médio para o desenvolvimento de um fármaco é de 10 a 15 anos. Segundo cálculos de abril de 2016, o custo estimado de um novo medicamento, incluindo-se as falhas, é de 2,6 bilhões de dólares (PhRMA, 2016).

O processo de descoberta e desenvolvimento de fármacos, independentemente do tipo de doença, é complexo. Este processo é dividido em duas etapas principais: descoberta (ou fase pré-clínica) e desenvolvimento (ou fase clínica) (Figura 5). A etapa de descoberta é subdividida em: pré-descoberta, que envolve o entendimento da doença e a escolha de um alvo e/ou classe química a ser utilizada como base de estudo; descoberta, que tem o objetivo de encontrar novos compostos ativos a partir de moléculas existentes (triagem de compostos naturais ou sintéticos) ou a geração de uma nova molécula baseada no complexo receptor/proteína de interesse; e por fim, estudos pré-clínicos, em que os compostos selecionados são testados quanto à eficácia e segurança em ensaios laboratoriais, *in silico* e em modelos animais. A fase clínica ou de desenvolvimento inicia-se com a investigação dos novos compostos pela agência regulatória baseada nos testes pré-clínicos, o que irá determinar a continuação dos estudos em ensaios clínicos. Uma vez aprovados, os compostos são denominados candidatos a fármacos e iniciam-se os testes em humanos em três fases: testes em pequeno grupo de voluntários saudáveis (fase I) seguido de grupos maiores de pacientes (fases II e III). Após aprovação dos resultados clínicos pela agência regulatória, o fármaco segue para a produção. Uma pesquisa pós-comercialização ou farmacovigilância avaliará os

efeitos decorrentes do uso prolongado do medicamento e possíveis interações medicamentosas (PhRMA, 2010)

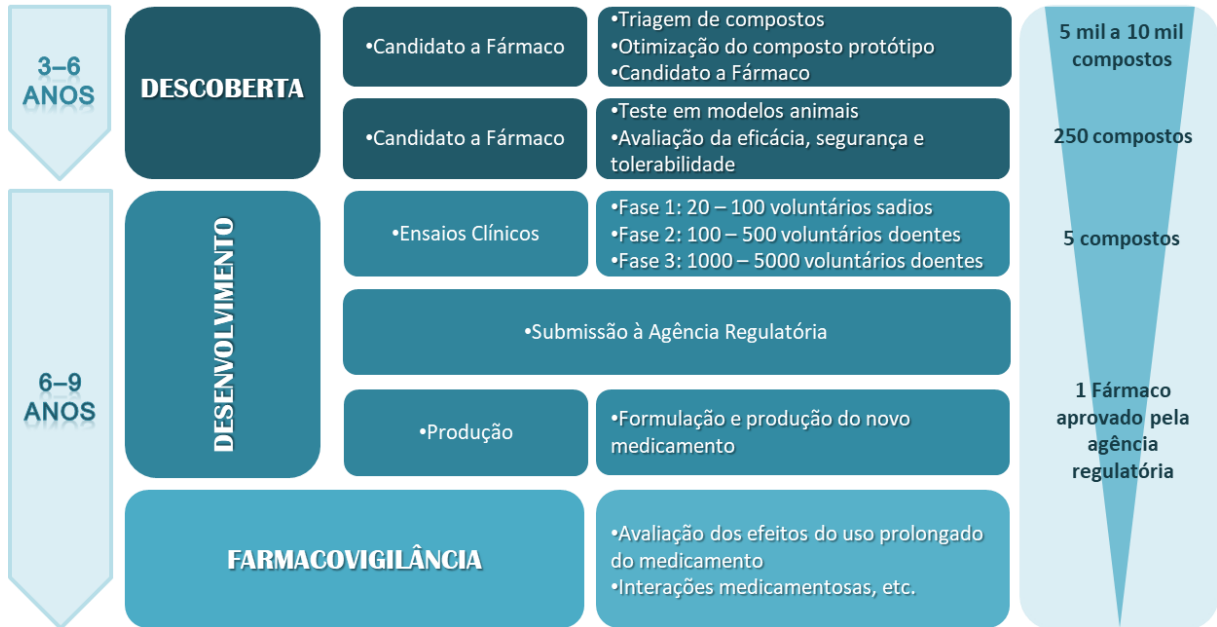


Figura 5 - Etapas do processo de descoberta e desenvolvimento de novos fármacos. O processo de descoberta de fármacos passa por diversas fases, cada uma das quais envolve etapas e regulamentações específicas. Adaptado de Pharmaceutical Industry Profile 2010. Washington, DC: PhRMA – Report 2010, Copyright (2010).

A descoberta de novos compostos ativos é baseada em várias estratégias, sendo as mais bem-sucedidas na área de doenças tropicais negligenciadas, a abordagem baseada em alvo (enzimas ou proteínas estruturais) e a abordagem de triagem fenotípica (GILBERT, LEROY, FREARSON, 2011). Outra importante abordagem nesta área é o redirecionamento de fármacos, a qual investiga, no agente patogênico, a atividade de fármacos utilizados para outras doenças (KLUG, GELB, POLLASTRI, 2016).

1.3.2.1 Abordagem baseada em alvos

Na era pós-genômica, a indústria farmacêutica tem empregado a triagem baseada em alvos para a descoberta de fármacos (Figura 6). A escolha do alvo terapêutico é etapa crítica no sucesso desta abordagem e depende de conhecimentos prévios sobre a fisiopatologia da doença e, no caso de patógenos, de características de seu ciclo de vida, mecanismo de infecção, virulência, etc. Como exemplos de alvos cita-se: determinado processo celular, um componente considerado modificador da doença, receptores, enzimas e estruturas celulares

específicas. O racional para o desenvolvimento de fármacos baseado em alvo é obter um inibidor para este alvo (KHURANA et al., 2015). Para isto, é fundamental a padronização prévia de um ensaio para monitorar o efeito de novos compostos.

Na Figura 6, resumem-se as vantagens e desvantagens desta abordagem. Como vantagem clara é a possibilidade de desenhar e sintetizar compostos com base na estrutura do alvo. Por outro lado, há desvantagens nesta abordagem. Os compostos são selecionados pela sua capacidade de inibir ou ativar um alvo biológico individual, entretanto, as células são capazes de redirecionar os caminhos de sinalização e de ativar outros mecanismos compensatórios de maneira imprevisível (KHURANA et al., 2015). Além disso, os compostos selecionados em ensaios *in vitro*, podem não atuar *in vivo* pela dificuldade de atravessar membranas celulares; por serem degradados por processos metabólicos defensivos ou por diferentes mecanismos de excreção.

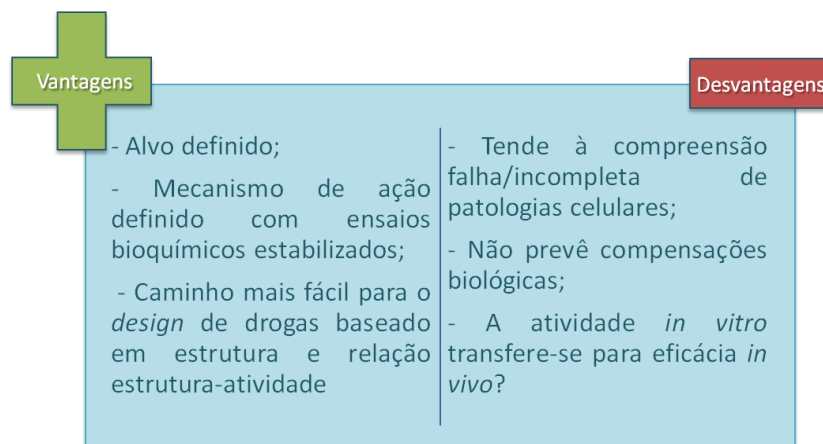


Figura 6 - Triagem baseada em alvos. Adaptado de KHURANA et al., 2015.

Na família Trypanosomatidae, os alvos enzimáticos mais estudados para fins de quimioterapia são enzimas. Como exemplos citam-se: enzimas da via da biossíntese do ergosterol, da via glicolítica, da síntese de poliaminas, a cisteína protease, a superóxido dismutase, a tripanotiona redutase, DNA topoisomerases, a hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, dentre outras (MELOS, ECHEVARRIA, 2012).

A seguir, citaremos algumas características de enzimas de *T. cruzi* consideradas alvos para a descoberta de fármacos.

T. cruzi sintetiza ergosterol de forma similar aos fungos, mas não sintetiza colesterol, encontrado em células animais. Na via de biossíntese do ergosterol, as enzimas

hidroximetilglutaril-coenzima A redutase, esqualeno epoxidase, C14 α -esterol desmetilase e esterol 24-C-metiltransferase são alvos quimioterápicos bastante estudados (URBINA, 2009).

As enzimas da via glicolítica despertam interesse devido à alta dependência do *T. cruzi* pela glicose visando a produção de ATP. Dentre as enzimas alvo, destaca-se a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) (VERLINDE et al., 2001).

Na via de síntese de poliaminas (moléculas que regulam o crescimento e diferenciação celular, além de funcionarem como substrato para a tripanotiona redutase) destacam-se como alvos significativos a ornitina descarboxilase e a S-adenosil-L-metionina descarboxilase (BRUN et al., 1996).

As enzimas cisteína-proteases participam de uma série de processos importantes em protozoários da família Trypanosomatidae. A cruzaina, principal cisteína-protease do *T. cruzi*, foi implicada na transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos no inseto vetor, na infecção de tripomastigotas na célula de mamífero, em processos anti-apoptóticos, na virulência do parasito, dentre outros (DUSCHAK, COUTO, 2009; MELOS, ECHEVARRIA, 2012). Muitos inibidores de cisteína-protease foram estudados, um deles, a vinilsulfona K777 se mostrou eficaz em modelos animais da doença de Chagas. O tratamento de camundongos infectados com K777 provocou a redução da carga parasitária e das lesões cardíacas, enquanto que em cães da raça *Beagle* foi observada melhora significativa da doença cardíaca induzida pela infecção por *T. cruzi* (BARR et al., 2005) O progresso do desenvolvimento do fármaco foi interrompido em 2005 devido à hepatotoxicidade. Outros medicamentos aprovados quimicamente relacionados com K777 estão sendo estudados atualmente (MCKERROW et al., 2009).

Nos tripanossomatídeos, as topoisomerases desempenham importante papel na replicação do DNA do cinetoplasto (liberação dos minicírculos da rede de kDNA), além da ancoragem dos maxicírculos à membrana mitocondrial, sendo assim um alvo interessante (SHAPIRO, SHOWALTER, 1994).

Os tripanossomatídeos são inteiramente dependentes da enzima hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase (HGPRT) para a conversão de bases de purina a ribonucleotídeos, uma vez que são auxotróficos para estes compostos (FREYMANN et al., 2000).

Outro alvo quimioterápico é a enzima superóxido dismutase, que catalisa a dismutação do superóxido em oxigênio e peróxido de hidrogênio, por meio de reações alternadas de redução e de oxidação do metal (ferro, no caso do *T. cruzi*) em seu sítio ativo. A inibição da superóxido dismutase provoca estresse oxidativo no parasito pelo acúmulo do íon superóxido (TURRENS, 2004).

A enzima tripanotiona redutase (*TcTR*) é uma flavoproteína dissulfeto redutase dependente de NADH, exclusiva de tripanossomatídeos, que mantém a tripanotiona em sua forma reduzida. Este processo é essencial para manter um ambiente redutor extremamente importante para a sobrevivência do parasito (PITA, PASCUTTI, 2011).

A inibição da via dos folatos impede a formação do tetra-hidrofolato (essencial para a síntese das bases nitrogenadas), tornando a enzima di-hidrofolato redutase (DHFR) um alvo quimioterápico de muito interesse (SOARES-BEZERRA, LEON, GENESTRA, 2004).

Dado que a morfologia dos tripanossomatídeos é definida por seu citoesqueleto interno, as enzimas da biossíntese de microtúbulos desempenham papel fundamental para o parasito. É importante lembrar que a diferença estrutural entre as tubulinas de parasitos e mamíferos é de aproximadamente 18%. Um possível alvo para fármacos é a γ -tubulina, uma vez que desempenha um importante papel na regulação da nucleação dos microtúbulos e no funcionamento dos flagelos (GULL, 1999; MELOS, ECHEVARRIA, 2012).

1.3.2.2 Abordagem de triagem fenotípica

A abordagem de triagem fenotípica tem sido utilizada na descoberta de fármacos para a maioria dos agentes de doenças negligenciadas, tendo tido mais sucesso do que abordagens baseadas em alvo (FIELD et al., 2017).

No caso da abordagem de triagem fenotípica, o alvo não é conhecido e o efeito dos compostos é avaliado sobre características biológicas do patógeno. Para esta abordagem, os principais requisitos são bibliotecas químicas apropriadas para rastreamento, ensaios robustos e condições apropriadas de triagem (GILBERT, LEROY, FREARSON, 2011).

Existem vários ensaios disponíveis para a análise das respostas dos tripanossomatídeos a compostos. É especialmente importante estabelecer que os compostos sejam eficazes contra os estágios do ciclo de vida clinicamente relevantes, o que pode ser problemático para as formas de vida intracelular de *T. cruzi*, uma vez que os compostos devem atravessar várias membranas para atingir alvos do parasito.

Para identificar moléculas que sejam adequadas para a descoberta de fármacos, é essencial utilizar uma combinação apropriada de ensaios para aumentar a confiabilidade nos pontos de partida químicos. Por exemplo, a descoberta de pontos iniciais geralmente requer um ensaio de alto rendimento para acessar a diversidade química, seguida pela confirmação por ensaios mais fisiologicamente relevantes (baixo rendimento) (FIELD et al., 2017). Ensaios celulares adicionais que reproduzam a situação *in vivo* são importantes para sustentar

análises farmacocinéticas e farmacodinâmicas combinadas em modelos animais. Isto fornece uma indicação da concentração e tempo de exposição de um composto que são necessários para matar os parasitos em animais e para prever a situação em seres humanos (FIELD et al., 2017).

Utilizando um sistema de ensaios fenotípicos em célula total (*whole-cell phenotypic assay*) a GlaxoSmithKline realizou a triagem de um conjunto de 1,8 milhões de compostos por um processo de última geração denominado *High Throughput Screening* (HTS) (triagem de alta produtividade) contra os kinetoplastídeos patogênicos *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. A citotoxicidade dos compostos para células de mamífero foi investigada em células das linhagens HepG2 (células epiteliais hepáticas humanas) e em NIH-3T3 (fibroblastos embrionários de camundongo). Análises de bioinformática foram utilizadas para desenvolver hipóteses sobre o modo de ação dos compostos. Assim, foram identificados 192 compostos promissores contra *L. donovani* (Leish-Box), 222 contra *T. cruzi* (Chagas-Box) e 192 contra *T. brucei* (HAT-Box). Interessantemente, foram observados três compostos presentes tanto na “Leish-Box” quanto na “Chagas-Box”; nove compostos na “Chagas-Box” e “HAT-Box”; e um composto ativo presente nas três categorias. Análises *in silico* mostraram que os alvos principais seriam predominantemente quinases, proteases e citocromos. Todos os dados do estudo e compostos estão disponíveis publicamente para encorajar a pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos para o combate destas doenças (PEÑA et al., 2015).

Para a doença de Chagas, pode-se considerar que a descoberta do Nifurtimox e do Benznidazol foi feita por abordagem fenotípica baseada no efeito de compostos sobre a redução da parasitemia em camundongos infectados. O histórico destas descobertas é descrito na revisão do Professor Zigman Brener (BRENER, 1984).

1.3.2.3 Redirecionamento de fármacos (*Drug repurposing*)

O redirecionamento de fármacos originalmente licenciados para outras doenças (*Drug repurposing*), e o resgate de compostos abandonados por indústrias farmacêuticas emergem como estratégias atraentes para novas terapias para doenças negligenciadas (SBARAGLINI et al., 2016). Estas estratégias apresentam a vantagem potencial de facilitar um desenvolvimento rápido e de menor custo, uma vez que os ensaios pré-clínicos e clínicos podem ser baseados em dados já disponíveis (ANDREWS, FISHER, SKINNER-ADAMS, 2014).

Alguns derivados azólicos, inibidores da biossíntese de ergosterol em fungos, comentados acima, foram reposicionados para a doença de Chagas (URBINA, 2009). Os compostos azólicos: Posaconazol, Ravuconazol e E-1224 (pró-droga do Ravuconazol) (Figura 7) já foram utilizados em ensaios clínicos. O primeiro ensaio clínico, CHAGASAZOL, foi conduzido na Espanha e tinha como objetivo comparar o efeito de BZ com o do Posaconazol administrado em duas doses por 60 dias (MOLINA et al., 2014). O resultado do ensaio mostrou a falha do Posaconazol para manter uma resposta sustentável durante o seguimento dos pacientes, ao contrário do BZ. O ensaio clínico de fase II com E-1224 também mostrou que este fármaco não foi capaz de sustentar a eliminação do parasito um ano após o final do tratamento (DNDi, 2013).

Outros inibidores seletivos da biossíntese de ergosterol, VNI [(R)-N-(1-(2,4-diclorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etil)-4-(5-fenil-1,3,4-oxadi-azol-2-il)benzamida] e VFV [(R)-N-(1-(3,4'-difluorobifenil-4-il)-2-(1H-imidazol-1-il)etil)-4-(5-fenil-1,3,4-oxadiazol-2-il)] mostraram elevada atividade na doença de Chagas experimental aguda em modelo murino (VILLALTA et al., 2013). Além disso, o VFV foi também eficaz contra a leishmaniose visceral (LEPESHEVA et al., 2015).

O Fexinidazol (1-metil-2-(p-(metiltio)-fenoxi) metil)-5-nitroimidazol) (Figura 7), um composto nitroheterocíclico que apresenta atividade antimicrobiana, mostrou ser um excelente candidato para a cura de tripanossomíase africana humana de estágio 2 (TORREELE et al., 2010). Em 2012, foi mostrada a eficácia do Fexinidazol em modelos murinos infetados com *T. cruzi* (BAHIA et al., 2012).

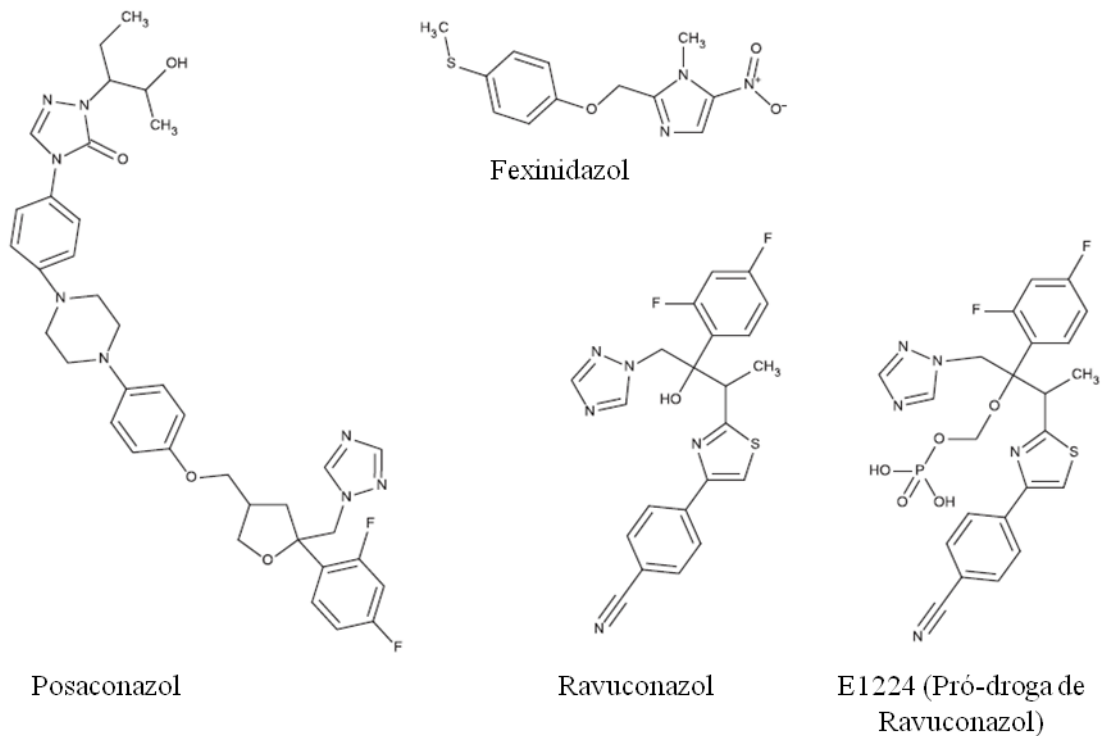


Figura 7 - Estruturas de derivados azólicos e do Fexinidazol. Extraído de BELLERA et al., 2015.

Dentre os fármacos reutilizados como potenciais tratamentos para a doença de Chagas, a Amiodarona chamou muita atenção, uma vez que é comumente prescrita para pacientes com arritmias derivadas da cardiomiopatia chagásica (SBARAGLINI et al., 2016). A Amiodarona (Figura 8) é um fármaco do grupo dos Antiarrítmicos da classe III usado no tratamento das arritmias cardíacas. Foi observado que a Amiodarona interrompe a homeostase de Ca^{2+} em *T. cruzi* induzindo a liberação deste íon das reservas intracelulares, especificamente da única gigante mitocôndria, levando à perda da viabilidade do parasito dentro de 24h (BENAIM et al., 2006). Interessantemente, alguns estudos mostraram que pacientes com cardiomiopatia chagásica tratados com Amiodarona apresentaram uma recuperação mais rápida e melhor quando comparados com outros pacientes tratados com agentes antiarrítmicos de outras classes (SBARAGLINI et al., 2016).

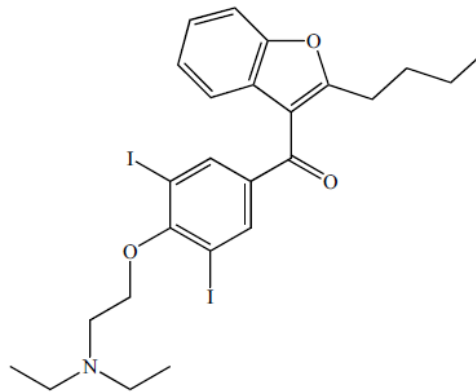


Figura 8 - Estrutura da Amiodarona. Extraído de SBARAGLINI et al., 2016.

Quando usados em combinação, Amiodarona e Posaconazol mostraram uma alta ação sinérgica em células (Vero) infectadas com amastigotas (de uma cepa virulenta isolada de um caso pediátrico em Carabobo, Venezuela), (BENAIM et al., 2006). Este fato torna interessante a possibilidade de usar esses fármacos combinados, em concentrações menores, com a vantagem de produzir menos efeitos colaterais.

SQ109 (Figura 9), utilizado no tratamento de formas resistentes de *Mycobacterium tuberculosis* também possui atividade contra outras bactérias, fungos e *P. falciparum*. SQ109 também apresentou forte atividade anti-*T. cruzi*, agindo contra todas as formas do parasito (tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas intracelulares), causando alterações ultraestruturais. SQ109 também atua sinergicamente com o Pozaconazol em amastigotas intracelulares, além de induzir a rápida alcalinização dos acidocalcisomas do parasito e ser capaz de ligar-se à esqualeno-sintase de *T. cruzi*, enzima importante envolvida na síntese de ergosterol deste parasito (VEIGA-SANTOS et al., 2015).

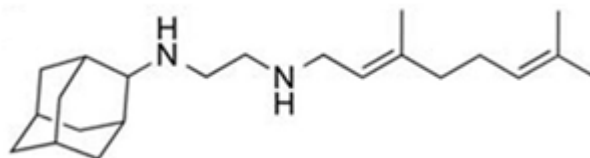


Figura 9 - Estrutura molecular de SQ109. Extraído de VEIGA-SANTOS et al., 2015.

Risendronato, utilizado no tratamento e prevenção da osteoporose pós-menopausa e no tratamento da doença de Paget óssea, é o bisfosfonato que exibiu o efeito mais potente em *T. cruzi*. Com doses de 1 mg/kg por dia, induziu a redução da parasitemia em torno de 90% em

modelos murinos de infecção aguda, sem reincidência após o fim do tratamento (GARZONI et al., 2004).

O redirecionamento de fármacos não está livre de inconvenientes. Uma desvantagem desta abordagem pode ser a relutância das empresas farmacêuticas em permitir que seus produtos sejam testados em uma classe não comercial de pacientes e, portanto, o risco de que toxicidades sejam descobertas, podendo prejudicar o potencial econômico de seus medicamentos (PINK et al., 2005). Um segundo problema é que fármacos reutilizados muitas vezes não se encaixam no Perfil de Produto Alvo (*Target Product Profile – TPP*), atributos essenciais necessários para que um medicamento específico seja um produto clinicamente bem-sucedido e de substancial benefício sobre as terapias existentes (WYATT et al., 2011), para doenças negligenciadas. Custos elevados, necessidade de hospitalização ou tratamento prolongado, fraca estabilidade em condições de alta temperatura e elevada umidade e falta de biodisponibilidade oral são apenas algumas das questões que devem ser abordadas para fármacos para doenças negligenciadas (FIELD et al., 2017).

Nesta dissertação iremos explorar características de derivados da Nifuroxazida (NF), o qual é um fármaco antimicrobiano, eleito composto-protótipo para realização de modificação molecular como abordagem de desenvolvimento de fármaco, conforme descrito no item seguinte, 1.3.3.

1.3.3 Derivados da Nifuroxazida (NF)

Nitrocompostos têm sido muito usados na terapêutica antimicrobiana. Destes, o nitrofurano Nifuroxazida (5-Nitro-2-furaldeído p-hidroxibenzoilhidrazona) (NF) (Figura 10) é um antibacteriano oral utilizado no tratamento de infecções intestinais. O grupo de pesquisa da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, chefiado pelo Prof. Leoberto Costa Tavares, sintetizou uma série de derivados benzofuroxânicos, análogos estruturais da NF. A escolha dos grupos substituintes foi baseada em suas propriedades físico-químicas, tais como efeito eletrônico e hidrofobicidade, empregando o diagrama de Craig. Alguns dos compostos apresentaram atividade contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes a múltiplas drogas (JORGE et al., 2011) e ação tripanocida contra formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y, DTU TcII) (JORGE et al., 2011; PALACE-BERL et al., 2013). Subsequentemente, 21 novos derivados da NF (5-nitro-2-furfurilidenohidrazidas substituídas) foram sintetizados por modificação molecular (Figura 10) e, em colaboração com nosso laboratório, foram ensaiados contra três cepas de *T. cruzi*, que representam as DTUs mais prevalentes em pacientes de

diferentes regiões da América Latina: TcI (no México e em países da América Central e do norte da América do Sul), TcII (no Brasil) e TcV (em países do Cone Sul da América do Sul) (ZINGALES et al., 2012). Todos os derivados, menos um, tiveram atividade tripanocida maior que BZ e 60% dos compostos foram mais eficazes que NFX (PALACE-BERL et al., 2015). A partir dos compostos que apresentaram maior atividade tripanocida, novos compostos foram planejados, sintetizados e ensaiados frente a formas epimastigotas das cepas Silvio X10 cl1 (TcI), Y (TcII) e Bug 2149 cl10 (TcV), assim como frente à cepa Colombiana (TcI), considerada resistente a BZ e NFX (FILARDI, BRENER, 1987).

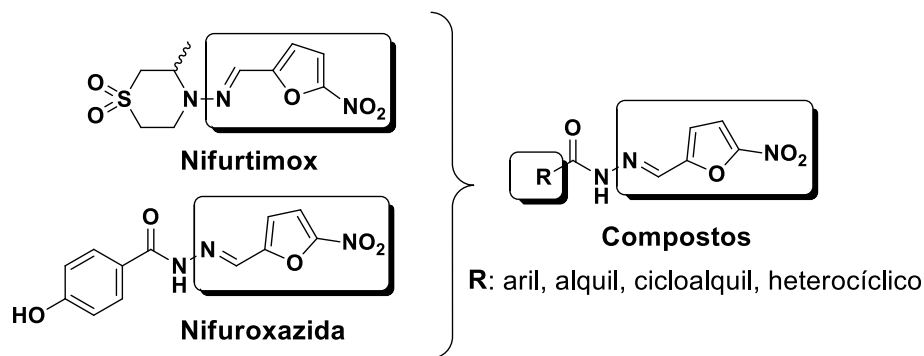


Figura 10 - Estrutura química do Nifurtimox, Nifuroxazida (composto protótipo) e esqueleto dos compostos planejados. As porções similares de NFX e NF foram mantidas nos novos compostos. Extraído de PALACE-BERL et al., 2015.

Finalmente, os compostos mais ativos foram ensaiados contra amastigotas intracelulares da cepa Y, com resultados que indicam sua elevada atividade. O conjunto de resultados, bem como o planejamento, síntese e os estudos qualitativos das relações estrutura-atividade (SAR) dos compostos foram tema da tese de doutorado de Fanny Palace-Berl (2016) e são descritos no artigo Palace-Berl et al. (2018), no qual somos um dos coautores. Nesta dissertação, alguns estudos serão apresentados.

2. JUSTIFICATIVA

Conforme comentado acima, os únicos dois fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas: BZ e NFX, embora bastante eficazes no tratamento de casos agudos e de recém-nascidos com Chagas congênito, apresentam falhas terapêuticas na fase crônica da doença e efeitos secundários que, em alguns casos, determinam a suspensão do tratamento. Desta forma, é prioritária a busca de novos tratamentos para esta doença.

Nesta direção, o laboratório chefiado pelo Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares (FCF-USP) sintetizou uma série de derivados do 5-nitrofurano, utilizando a Nifuroxazida (NF) como composto protótipo, que serão denominados derivados de NF. Estes compostos apresentam atividade contra formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*. Tendo em vista a diversidade genética e biológica das cepas deste parasito, e a existência de cepas naturalmente resistentes a BZ e NFX, é relevante verificar se os derivados de NF são também ativos contra outras cepas.

Uma vez comprovada sua ampla ação tripanocida, é importante verificar se os compostos não apresentam atividade citotóxica para células de mamífero.

Finalmente, sendo os derivados da NF nitrocompostos, propusemos caracterizar alguns aspectos de seu modo de ação que já foram investigados para BZ, NFX e para outros agentes tripanocidas. O primeiro deles refere-se à sua possível ativação por nitroredutases do parasito. Evidências apresentadas na Introdução indicam que a nitroredutase de tipo I mitocondrial *TcNTR* ativa os dois fármacos disponíveis para o tratamento de doença de Chagas. Foi também mostrado que BZ e NFX, assim como naftoquinonas, afetam alguns parâmetros do funcionamento da mitocôndria, tais como consumo de oxigênio e potencial de membrana e produção de peróxido de hidrogênio. Buscamos ainda verificar uma possível correlação entre os níveis de captação do composto e sua atividade tripanocida, bem como averiguar seu efeito sobre o DNA do parasito.

3. OBJETIVOS

O objetivo central do estudo foi avaliar a atividade anti-*T. cruzi* de derivados de NF e determinar algumas características relacionadas a seu modo de ação.

3.1 Objetivos específicos:

- a) Avaliar a atividade dos compostos contra formas epimastigotas de duas cepas de *T. cruzi*;
- b) Determinar a citotoxicidade para células de mamífero em cultura;
- c) Investigar a atividade de compostos promissores sobre formas tripomastigotas;
- d) Verificar se os derivados de NF são ativados pela nitroreductase de tipo I de *T. cruzi*;
- e) Determinar a cinética de captação dos compostos em formas epimastigotas;
- f) Verificar se derivados de NF afetam parâmetros do funcionamento mitocondrial;
- g) Averiguar o efeito dos compostos sobre o DNA de *T. cruzi*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas de *T. cruzi* e meios de cultura

Nos ensaios foram utilizadas formas epimastigotas de duas cepas isoladas de pacientes, Silvio X10 c11 e Colombiana, ambas pertencentes à DTU TcI (ZINGALES et al., 2009). Os epimastigotas foram cultivados em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)-hemina suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell) a 28 °C em estufa BOD (*Biochemical Oxygen Demand*, Fanem, modelo 347 CD) e repicados em fase exponencial de crescimento.

Para a comparação do efeito da composição do meio de cultura na atividade anti-*T. cruzi* de alguns derivados de NF utilizou-se também o meio LIT-hemoglobina e o meio Grace (*Grace's Insect Medium*, Gibco), suplementados com 10% SFB. A composição dos meios de cultura consta na Tabela 1.

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados (quantidade/L)		
Nutrientes	LIT-Hemina	LIT-Hemoglobina
Triptose	20 g	5 g
NaCl	16 g	4 g
Na ₂ HPO ₄	32 g	15 g
KCl	1,6 g	0,4 g
Penicilina	0,180 g	0,15 g
Estreptomicina	0,180 g	0,15 g
Glicose	10 g	2 g
Infusão de Fígado (LIB)	5 g	5 g
Hemoglobina fetal	-	60-80 mL
Hemina	0,025 g	-
Nutrientes	Meio Grace	
Meio Grace ^a	44 g	
Bicarbonato de sódio	0,35 g	
Penicilina	0,1 g	
Estreptomicina	0,13 g	
Vermelho de fenol	0,015 g	

^a Ver composição em <<http://thermofisher.com/br/en/home/technical-resources/media-formulation.73.html>>

4.2 Atividade dos compostos sobre formas epimastigotas

A avaliação da atividade anti-*T. cruzi* dos derivados de NF foi realizada frente a formas epimastigotas das cepas Silvio X10 c11 e Colombiana, cultivadas em meio LIT-hemina suplementado com 10% SFB. Os parasitos, em fase exponencial de crescimento,

foram distribuídos em placas de 96 poços em uma densidade de 10^7 parasitos/mL, em volume final de 200 μ L, e expostos a diferentes concentrações dos compostos por 72 h a 28 °C. As soluções estoque dos compostos (4,8 mM) foram preparadas em 100% DMSO. A atividade parasiticida dos fármacos de referência BZ e NFX foi também avaliada. Como controle, os parasitos foram incubados em ausência de compostos. Em todos os ensaios manteve-se constante a concentração final de 1% DMSO. Ao término do período de incubação, as placas foram homogeneizadas em agitador de microplacas. Alíquotas das culturas foram retiradas, procedendo-se a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Os resultados apresentados referem-se a duas réplicas biológicas, realizadas em dias diferentes, sendo que cada réplica continha triplicatas dos pontos experimentais. O valor da CI_{50} , que corresponde à concentração do composto que inibe 50% do crescimento da cultura, foi calculado com o programa *OriginPro 8* (versão 8.0 SR00, OriginLab, Northampton, MA, USA).

4.3 Determinação da citotoxicidade para células LLC-MK₂

A citotoxicidade dos compostos para células da linhagem LLC-MK₂, derivadas de células epiteliais renais de macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) (HULL, CHERRY, TRICH, 1962), foi determinada com base na redução do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Desidrogenases celulares presentes em células metabolicamente ativas atuam no MTT (de cor amarela), originando o composto formazan (de cor púrpura) que é insolúvel em soluções aquosas e solúvel em DMSO (MOSMANN, 1983).

4.3.1 Cultura de células LLC-MK₂

As células LLC-MK₂ foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco) suplementado com 3,7g/L de bicarbonato de sódio, 0,13g/L de estreptomicina e 0,19 g/L de penicilina. O meio foi esterilizado por sistema de filtração a vácuo com membrana de Polietersulfona de 0,22 μ m (Thermo Scientific) e posteriormente suplementado com 10% de SFB (Vitrocell). As monocamadas de células foram mantidas em garrafas de poliestireno com tampa com filtro e área de crescimento de 75 cm² (TPP). Para os ensaios de citotoxicidade, as monocamadas foram lavadas três vezes com Tampão Fosfato-Salino (PBS), pH 7,4 e incubadas com 2 mL de tripsina (Tripsina-EDTA 0,05%) (Gibco) por

5 min em estufa a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂. As células foram ressuspensas em 8 mL de meio DMEM, e foi realizada a contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico.

4.3.2 Determinação da citotoxicidade para células LLC-MK₂

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços de fundo plano em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com 10% SFB. Alíquotas de 160 µL contendo 5x10⁵ células foram distribuídas em cada poço e as placas foram incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 24 h para aderência das células. Após este período, diferentes concentrações dos compostos, em presença de uma concentração fixa de 0,5% DMSO, foram adicionadas às células por 72 h, a 37 °C em atmosfera de 5% CO₂. O controle positivo foi incubado em ausência de composto e em presença de 0,5% DMSO. Ao término da incubação, as placas foram centrifugadas a 130 x g a 20 °C por 10 min, foram removidos 150 µL do meio e adicionados 150 µL de meio RPMI 1640 com 10% SFB para “lavagem” do composto. As placas foram centrifugadas novamente, retirados 100 µL do meio e adicionados 100 µL/poço de MTT a 1 mg/mL (Sigma). As placas foram incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂ por 2,5 h. Após a incubação, as placas foram centrifugadas a 130 x g por 10 min a 20 °C, foram retirados 150 µL do sobrenadante e adicionados 150 µL/poço de DMSO pré-aquecido a 56 °C. As placas foram agitadas, protegidas da luz, em agitador de microplacas (modelo Uni-Mixer, Uniscience) por 30 min para total solubilização do formazan. A coleta de dados foi realizada em leitora de microplacas (modelo Epoch, BioTek) no comprimento de onda de 590 nm.

4.3.3 Tratamento dos dados de citotoxicidade

Os valores da absorbância a 590 nm (Abs₅₉₀) foram tratados de forma a obter a porcentagem de inibição do crescimento celular (%IC). Para isto, utilizou-se a equação 01:

$$\%IC = \{1 - [(A_{cc} - A_{cc-bco}) \div (A_c - A_{c-bco})]\} \times 100 \quad (01)$$

Em que:

A_{cc} = Abs₅₉₀ da cultura celular;

A_{cc-bco} = Abs₅₉₀ do branco da diluição do composto;

A_c = Abs₅₉₀ da cultura na ausência de qualquer composto;

A_{c-bco} = Abs₅₉₀ do branco equivalente ao meio RPMI 1640 com 10% SFB.

Os dados obtidos da %IC das triplicatas de ensaios independentes foram tratados calculando sua média e desvio-padrão, e posteriormente o valor de CC_{50} , que corresponde à concentração do composto que inibe a viabilidade de 50% das células, através da equação 02 (MAHATA et al., 2012):

$$CC_{50} = \left[\frac{(50-A)}{(B-A)} \right] \times (D - C) + C \quad (02)$$

Onde:

- A = o primeiro ponto, expresso em porcentagem de inibição, menor do que 50%;
- B = o primeiro ponto, expresso em porcentagem de inibição, maior ou igual a 50%;
- C = a concentração de composto que promove A% de inibição;
- D = a concentração de composto que promove B% de inibição.

4.4 Avaliação da atividade de derivados de NF sobre formas tripomastigotas

Formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Colombiana foram obtidas a partir da diferenciação de 2×10^7 epimastigotas/mL em meio LIT-10% SFB, contendo 20% (v/v) de meio Grace, a 28 °C, por um período de 7 a 10 dias (ZINGALES et al., 1997). Essas formas foram utilizadas para iniciar a infecção de monocamadas de células LLC-MK₂, cultivadas como descrito no item 4.3.1. Monocamadas semi-confluentes foram infectadas com $1,2 \times 10^7$ tripomastigotas metacíclicos em meio DMEM-2% SFB. Após 24 h de incubação a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂, o meio de cultura foi aspirado para remoção dos parasitos que não infectaram as células. As monocamadas foram mantidas em meio DMEM-2% SFB nas mesmas condições acima. Formas tripomastigotas foram observadas no sobrenadante da monocamada a partir do 7º dia pós-infecção. Os parasitos foram recuperados do meio de cultura por centrifugação a 3.900 x g por 7 min a 4 °C e utilizados imediatamente nos ensaios. Os tripomastigotas foram incubados com uma concentração única de cada composto (1 µM) a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, por 20 h. Em seguida, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer.

4.5 Compostos escolhidos para o estudo

Dentre os derivados de NF sintetizados no laboratório do Prof. Dr. Leoberto Costa Tavares, cinco compostos foram escolhidos para a posterior caracterização dos parâmetros descritos abaixo. Os compostos são especificados na Tabela 9, em Resultados.

4.6 Ativação dos derivados da NF pela Nitroredutase de tipo I

4.6.1 Obtenção e purificação da Nitroredutase de tipo I de *T. cruzi* (*TcNTR*)

O gene da *TcNTR* (GenBank XM_805552) possui 939 pb. A porção correspondente ao sítio catalítico, compreendida entre os nucleotídeos 222 e 939 foi clonada no vetor pTrcHis-C (Figura 11A), pelo Dr. Shane Wilkinson (*School of Biological and Chemical Sciences, Queen Mary University of London, UK*), que gentilmente nos cedeu esse plasmídeo.

Bactérias *E. coli* BL21pGRO7 foram transformadas com o plasmídeo recombinante por técnicas convencionais. Esta linhagem bacteriana é utilizada para a expressão de proteínas recombinantes com elevada estabilidade, por ser deficiente na produção das proteases lon e ompT. *E. coli* BL21pGRO7 contém o plasmídeo pGRO7 (Figura 11B), que codifica as chaperonas groES e groEL que, por sua vez, propiciariam o enovelamento correto da proteína recombinante, evitando a formação dos corpos de inclusão (Chaperone Competent Cell BL21 Series, Takara Bio Inc.) A expressão das chaperonas é induzida por arabinose.

Uma colônia recombinante de *E. coli* BL21pGRO7-pTrcHis-C-*TcNTR* foi cultivada em meio NZCYM a 25 °C sob agitação. A expressão das chaperonas foi induzida por 0,5 mg/mL de L-arabinose. Quando a cultura atingiu uma D.O._{600nm} = 0,6, a expressão da *TcNTR* foi induzida com 100 µM de IPTG por 6 horas, a 25 °C.

Para a purificação da *TcNTR*, seguimos o protocolo descrito por Wilkinson et al. (2008). As bactérias foram rompidas pela adição de 1 mg/mL de lisozima, seguida de incubação por 30 min em gelo, e sonicação (ciclos de 30 seg, por 30 min com amplitude de 50%). Após centrifugação, o sobrenadante foi carregado em coluna de Níquel (Ni-NTA, Qiagen), pois a *TcNTR* recombinante apresenta uma cauda de Histidina (ver Resultados). A coluna foi lavada sequencialmente com concentrações crescentes de imidazol (50 mM e 100 mM). A *TcNTR* foi eluída com 500 mM de imidazol, coletando-se frações de 200 µL. As frações que contêm a proteína recombinante apresentam coloração amarela, sugestiva da presença de FMN. A concentração proteica das frações foi determinada pelo método de Bradford.

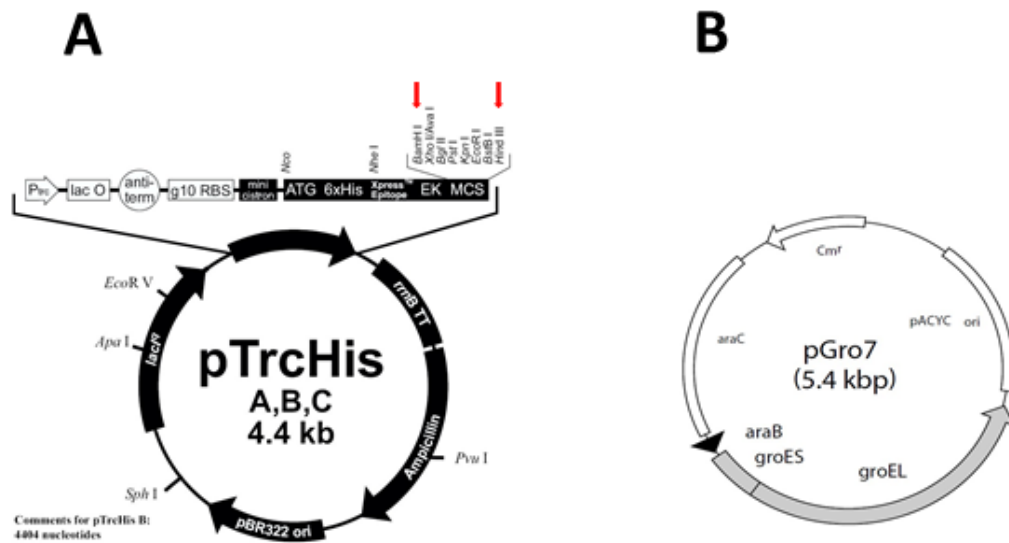


Figura 11 - Mapa dos plasmídeos utilizados para a expressão da *TcNTR*. A – plasmídeo pTrcHis: a porção catalítica da *TcNTR* foi clonada na região entre os sítios *Bam*HI e *Hind*III (setas). B - plasmídeo pGro7 contendo os genes *groEL* e *groES*.

4.6.2 Padronização das condições para monitorar a atividade da NTR

A padronização das condições para monitorar a atividade da *TcNTR* foi feita com a enzima de *E. coli* (Sigma, N9284-1MG), utilizando protocolo adaptado de Zenno e colaboradores (1996), que se baseia no monitoramento da mudança da absorvância da amostra a 340 nm promovida pela oxidação de NADH a NAD^+ , segundo a equação 03:



Para a determinação da velocidade inicial, a mistura da reação (1 mL) continha 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 7,0); 0,1 mM de NADH e 0,1 mM do aceptor de elétrons (compostos). A reação foi iniciada pela adição de 2 μg da NTR de *E. coli* e foi monitorada em espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV-Vis a 24 °C, no comprimento de onda de 340 nm.

A velocidade inicial (V_0) foi registrada a cada 15 segundos nos dois minutos iniciais da reação. Para calcular a quantidade de NADH oxidado, utilizamos seu coeficiente de absorvância molar ($\epsilon_{340} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A atividade específica (*a.e.*) da NTR foi expressa em nmoles de NADH oxidado/min/mg de proteína (ver Resultados).

4.6.3 *Atividade da nitroreductase de T. cruzi (TcNTR) sobre derivados de NF*

A atividade da TcNTR foi medida nas condições padronizadas no item 4.6.2. A reação foi iniciada pela adição de 26 µg da TcNTR purificada na coluna de Níquel (ver Resultados).

4.7 **Determinação da cinética de captação dos compostos**

Para determinar o acúmulo intracelular dos compostos, foram adaptados protocolos descritos por Boiani e colaboradores (2010) e Zhou e colaboradores (2015). Nessas abordagens, a quantidade de composto interiorizado é inferida a partir da redução da concentração do composto no meio de incubação. A concentração do composto, por sua vez, é aferida a partir do valor de sua absorvância no comprimento de onda apropriado e do valor do coeficiente de absorvidade molar (ver detalhes abaixo).

4.7.1 *Espectro de absorção e coeficiente de absorvidade molar dos compostos*

Foram determinados os espectros de absorção do NFX e dos derivados da NF na concentração de 50 µM em tampão Tris-HCl 50 mM (pH 7,0), e em meio A/G (NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂PO₄ 15 mM; glicose 10 mM) na ausência ou presença de soroalbumina bovina (BSA) 10 mg/mL. O coeficiente de absorvidade molar (ε), que representa a capacidade que um mol de uma determinada substância possui em absorver luz a um determinado comprimento de onda, foi determinado com base nos valores de absorvância obtidos no comprimento de onda de absorção máxima (ver Resultados) pela equação de Beer-Lambert (equação 04):

$$\varepsilon = \frac{A}{l \times c} \quad (04)$$

Onde: ε = coeficiente de absorvidade molar;

A = absorvância no comprimento de onda de absorção máxima;

l = distância percorrida pela luz (cm);

c = concentração da solução (M).

4.7.2 Cinética de captação dos compostos por formas epimastigotas

Para avaliar a cinética de captação dos compostos pelas formas epimastigotas de *T. cruzi* foi utilizado método adaptado de Boiani e colaboradores (2010). Uma cultura da cepa Silvio X10 c11 em fase exponencial de crescimento em meio LIT-hemina-10% SFB foi centrifugada a 3.900 x g por 7 min e ressuspensa em meio A/G + BSA 10 mg/mL na concentração de 10⁸ parasitos/mL. A suspensão (9 mL) foi dividida em Erlenmeyers e incubada por 1h a 4 °C ou a 28 °C, com agitação de 60 rpm, para que os parasitos se adaptassem a esse meio. Em seguida, a cada cultura foi adicionado um dos compostos na concentração final de 50 µM e 1% DMSO. Após rápida agitação, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas de cada cultura (tempo 0 min.) (ver procedimento abaixo), e as culturas foram incubadas nas duas temperaturas mencionadas. Aos 30, 60, 90 e 120 min, alíquotas de 1,5 mL foram retiradas e centrifugadas a 16.400 x g por 3 min. O sobrenadante foi recolhido e a absorbância do meio foi determinada em espectrofotômetro no comprimento de onda de absorção máxima de cada composto. A quantidade de composto interiorizada pelos parasitos em cada tempo de incubação foi calculada a partir da redução da absorbância do meio em relação ao valor da absorbância no tempo 0 min., levando-se em conta o valor da absorvidade molar do composto (ϵ) (equação 05).

$$Q_{(M)} = \frac{Abs.t_0 - Abs.t_x}{\epsilon} \quad (05)$$

Onde: $Q_{(M)}$ = Quantidade de composto interiorizada (Molar)

Abs.t₀ = Absorbância do meio no tempo 0 min

Abs.t_x = Absorbância do meio no tempo X min

ϵ = Coeficiente de absorvidade molar

4.8 Efeito dos compostos sobre a atividade desidrogenásica do *T. cruzi*

MTT é reduzido para formar o produto formazan ao aceitar elétrons de equivalentes redutores celulares (NADH, NADPH), sendo, portanto, um reflexo da atividade de desidrogenases, a maior parte das quais é mitocondrial. Por outro lado, em alguns tipos de células a redução do composto é atribuída também a uma atividade redox citosólica (BERRIDGE, TAN, 1993). Formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 em fase exponencial de crescimento em meio LIT 10% SFB foram centrifugadas a 3.900 x g por 7 min e

ressuspendidas em meio A/G + BSA 10 mg/mL na concentração de 10^8 parasitos/mL. Um mL da suspensão parasitária foi distribuído nos poços de uma placa de 24 poços. Os parasitos foram incubados a 28 °C por 1 h para se adaptarem ao meio, e após este período, foram adicionados os compostos na concentração final de 50 μ M, em presença de DMSO 1%. Foram feitas triplicatas de cada amostra. As amostras foram incubadas por 2 h a 28 °C. De tempos em tempos, alíquotas de 100 μ L foram transferidas para uma placa de 96 poços, e adicionados 10 μ L de MTT 5 mg/mL. A placa foi incubada a 28 °C por 2,5 h para o ensaio do MTT. Após incubação com MTT, foram adicionados 100 μ L de DMSO pré-aquecido a 56 °C em cada poço e a placa foi homogeneizada em agitador de microplacas por 30 min protegida da luz. A produção de formazan foi monitorada a 610 nm (Epoch Microplate Spectrophotometer – BioTek Instruments Inc, USA).

4.9 Consumo de oxigênio

O consumo de oxigênio foi determinado em oxígrafo de alta resolução (Oxígrafo-2K, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Áustria) sob agitação constante de 350 rpm em volume final de 2 mL a 28 °C. O ensaio foi iniciado pela adição de 1 mL de uma suspensão parasitária (10^7 parasitos) em 1 mL de meio A/G + BSA 10 mg/mL à câmara do aparelho. O eletrodo foi calibrado com meio A/G + BSA 10 mg/mL a 28 °C. A concentração e o fluxo de oxigênio foram registrados usando o *software* DatLab (Oxígrafo-2K, OROBOROS Instruments, Innsbruck, Áustria). A análise dos dados foi realizada utilizando teste de regressão linear no programa OriginPro 8 (versão 8.0 SR00, OriginLab, Northampton, MA, USA). O efeito dos derivados de NF no consumo de oxigênio foi avaliado após prévia exposição dos parasitos aos compostos (concentração final de 50 μ M em presença de 1% DMSO) por 2h a 28 °C..

4.10 Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mitocondrial

A determinação do peróxido de hidrogênio produzido por formas epimastigotas foi realizada em espectrofluorímetro Hitachi F-4500 equipado com agitador e cubetas termorreguladas a 28 °C. Epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram ressuspensos em meio A/G + BSA 10 mg/mL e incubados com NFX, os derivados de NF ou Menadiona, nas concentrações especificadas em Resultados. Uma alíquota da suspensão parasitária foi adicionada ao meio para uma concentração de 5×10^7 células/mL (aproximadamente 1 mg de proteína/mL). Para a determinação da quantidade de H₂O₂

liberada, utilizou-se o protocolo ligeiramente modificado de Carranza et al. (2009). A reação foi iniciada pela adição de 50 μM de *Amplex red* (*10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine*) e 1 U/mL de HRP (*horseradish peroxidase*). Em presença da peroxidase, o *Amplex red* reage com a H_2O_2 formada, numa estequiometria 1:1, para gerar um produto de oxidação vermelho-fluorescente denominado resorufina. Esta foi quantificada por absorção e emissão de fluorescência a 563 nm e 587 nm, respectivamente. A concentração de H_2O_2 foi determinada usando uma curva de calibração com concentrações conhecidas de H_2O_2 recém-preparado.

4.11 Efeito dos compostos sobre o DNA do *T. cruzi*

O efeito dos compostos sobre o DNA de *T. cruzi* foi investigado seguindo-se a abordagem experimental descrita anteriormente (REGIS-DA-SILVA et al., 2006; RAJÃO et al., 2014). Nestes estudos, os autores mostram que a exposição de epimastigotas à radiação ionizante ou a BZ causa extensa fragmentação do DNA, que pode ser evidenciada pelo padrão de migração em PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*, eletroforese em gel de campo pulsado). Epimastigotas (10^8 formas) foram submetidas a diferentes tratamentos (ver Resultados) e incluídas em blocos de agarose de baixa temperatura de fusão, como descrito anteriormente (CANO et al., 1995). PFGE foi realizada em gel de agarose 1%, em tampão TBE 0,5X, em equipamento CHEF Mapper XA System (Bio-Rad). Foi utilizado o programa “*Two state*” do equipamento que consiste em dois vetores de campo, com a mesma tensão e duração, mas separados por um ângulo de 120° , empregando pulsos de 50 a 120 seg e 3,5 V/cm. O tempo de eletroforese foi 16 h a 14°C , ao término do qual as bandas de DNA foram visualizadas por coloração com brometo de etídio.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito da composição do meio de cultura na atividade de derivados de NF

Formas epimastigotas de *T. cruzi* são cultivadas normalmente em meio LIT suplementado com 10% SFB. Desde as primeiras tentativas de cultivo de tripanossomatídeos de mamíferos *in vitro* ficou clara a necessidade de suplementar o meio com hemácias ou com derivados de sangue (NOVY, MCNEAL, 1904; TOBEY, 1906). Ao longo dos anos, vários estudos mostraram a incapacidade desses organismos de sintetizar o grupo heme (NOVY, MCNEAL, 1904; TOBEY, 1906; KOŘENÝ, LUKEŠ, OBORNÍK, 2010; ALVES et al., 2011).

Em nosso laboratório, para o cultivo de formas epimastigotas de *T. cruzi*, há duas formulações de meio LIT, nas quais a fonte de heme pode ser suplementada com Hemoglobina (Hb) (6 a 8%) ou Hemina (He) (25 mg/L) (ver composição dos meios na Tabela 1 em Materiais e Métodos). Decidimos verificar a influência da formulação do meio LIT na atividade de derivados de NF. Inicialmente analisamos o efeito dos dois meios no tempo de duplicação (*td*) das cepas Silvio X10 c11 e Colombiana. Como controle, analisamos esse parâmetro também no meio de cultura Grace, um meio que contém sais inorgânicos, aminoácidos, vitaminas, glicose, sacarose e ácidos carboxílicos (ver Tabela 1 em Materiais e Métodos). Os três meios foram suplementados com 10% SFB. Na Tabela 2 apresentamos os valores do *td*, calculados na fase exponencial de crescimento dos parasitos. Os valores obtidos em três ensaios independentes indicam variação do *td* de acordo com o meio de cultura utilizado. Como esperado, quanto mais rico em nutrientes é o meio, menor o *td* dos parasitos. Observamos ainda haver pequena variação no valor do *td* das duas cepas no mesmo meio de cultura.

Tabela 2 - Tempo de duplicação^a, em horas, das cepas Silvio X10 c11 e Colombiana.			
Cepas	LIT-He	LIT-Hb	GRACE
Silvio X10 c11	20,51 ± 0,21	38,92 ± 2,35	43,21 ± 3,52
Colombiana	25,61 ± 1,35	33,65 ± 1,80	41,47 ± 2,56

^a Calculado na fase exponencial de crescimento.

Para verificar o efeito da composição do meio de cultura nos valores da CI₅₀, (concentração do composto que inibe 50 % do crescimento da cultura), escolhemos os compostos c15 e c14 que, em ensaios com a cepa Y em meio LIT-Hb, haviam mostrado,

respectivamente, elevada e baixa atividade tripanocida (dados não apresentados). O valor da CI_{50} obtido após 72 h de incubação com cada um dos compostos para as cepas Colombiana e Silvio é mostrado na Tabela 3. Os valores foram obtidos a partir de dois ensaios biológicos com duas réplicas técnicas cada.

Meio	Composto 15		Composto 14	
	Colombiana	Silvio X10 cl1	Colombiana	Silvio X10 cl1
LIT-Hemina	2,56 \pm 0,10	2,78 \pm 0,63	107,20 \pm 2,17	122,68 \pm 3,09
LIT-Hemoglobina	2,22 \pm 0,34	2,31 \pm 0,02	99,00 \pm 1,60	102,06 \pm 1,63
GRACE	1,77 \pm 0,22	1,83 \pm 0,30	83,25 \pm 1,68	86,15 \pm 2,32
P	0,020	0,067	0,067	0,067

Dados apresentados em média e desvio padrão (d.p.). Teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis. Intervalo de confiança de 95%.

A análise estatística, baseada no teste de Kruskal-Wallis, indica não haver diferenças estatisticamente significativas para os valores de CI_{50} obtidos para cada composto, para cada cepa, nos meios LITs, assim como entre as cepas. Apenas o composto 15 apresentou diferença significativa entre os valores de CI_{50} frente à cepa Colombiana ($P < 0,05$).

Visando a padronização dos ensaios, passamos a utilizar apenas o meio LIT-He para o cultivo de epimastigotas por ser de mais fácil preparo.

5.2 Atividade de derivados de NF sobre formas epimastigotas de *T. cruzi*

A atividade parasiticida de vários derivados da NF contra formas epimastigotas da cepa Silvio X10 cl1 foi ensaiada conforme descrito em Materiais e Métodos. Na Tabela 4 apresentamos os valores da CI_{50} obtidos em duas réplicas biológicas cada uma com triplicatas. Como controle negativo, os parasitos foram incubados em ausência de composto. Como controle positivo, os parasitos foram incubados com BZ e com NFX, fármacos usados no tratamento da doença de Chagas.

Tabela 4 – Atividade de derivados da NF contra formas epimastigotas da cepa Silvio.	
Compostos	CI₅₀ (μM)^a (média ± d.p.)
BZ	27,36 ± 2,08
NFX	5,77 ± 0,36
c1	23,55 ± 0,63
c2	9,16 ± 0,26
c5	8,71 ± 1,98
c13	3,78 ± 0,86
c15	2,73 ± 0,27
c19	4,20 ± 0,05
c20	2,84 ± 0,17

^a Os valores de CI₅₀ (μM), apresentados como média ± d.p., correspondem a triplicatas de duas réplicas biológicas.

Os resultados indicam que todos os derivados de NF ensaiados apresentam atividade tripanocida maior que BZ e quatro deles (c13, c15, c19 e c20), maior que NFX.

5.3 Determinação da citotoxicidade de derivados da NF

A citotoxicidade dos compostos foi avaliada em monocamadas de células LLC-MK₂ (células epiteliais renais de macaco Rhesus), utilizando-se o ensaio do MTT, conforme descrito em Materiais e Métodos. Na Figura 12 mostra-se o aspecto da monocamada e a coloração do formazan formado a partir da atividade desidrogenásica das células.

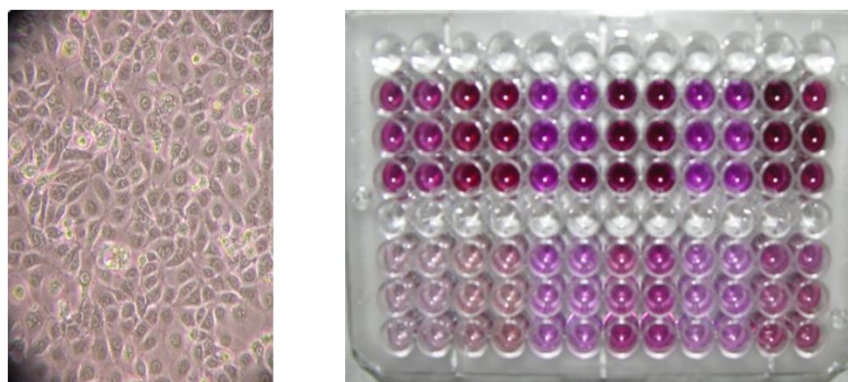


Figura 12 - Aspecto da monocamada de células LLC-MK₂ e da coloração do formazan formado no ensaio do MTT.

Inicialmente, para comprovar a eficiência do ensaio, as monocamadas foram incubadas com diferentes concentrações de azida sódica (Tabela 5), conhecido inibidor da citocromo c oxidase, ou complexo enzimático IV, que participa da cadeia de transporte de

elétrons mitocondrial. Observamos uma inibição de crescimento de cerca 98% a partir da menor concentração utilizada - 3 μM . Concentrações menores de azida não foram ensaiadas.

Concentração	% de inibição de crescimento
3 μM	97,92
30 μM	98,60
300 μM	99,60
900 μM	96,84

Em seguida, foi determinada a citotoxicidade dos 7 derivados de NF descritos na Tabela 4, assim como de BZ e de NFX. Os dados apresentados na Tabela 6 indicam que os compostos apresentam baixa citotoxicidade para as células de mamífero que, porém, para alguns derivados, é maior que a de BZ e NFX.

Composto	% de inibição da viabilidade celular na concentração de 160 μM
Benznidazol	0
Nifurtimox	0
c1	5,79
c2	51,82
c5	32,64
c13	0
c15	0
c19	0
c20	23,87

Em trabalho subsequente, Fanny Palace-Berl desenhou e sintetizou outra série de derivados da NF que apresentaram incremento da atividade contra formas epimastigotas de cepas das DTUs TcI, TcII e TcV e contra epimastigotas da cepa Colombiana, que, conforme comentado anteriormente, é resistente a BZ e NFX. Os resultados foram apresentados na tese de doutorado da pesquisadora (PALACE-BERL, 2016). Nesse estudo, nós analisamos a citotoxicidade dos novos compostos (Tabela 7), cuja estrutura é descrita em Palace-Berl et al. (2018).

Tabela 7 – Citotoxicidade de derivados da NF para células LLC-MK₂ e índice de Seletividade (IS).

Composto	LLC-MK ₂	Silvio X10 c11	Colombiana
	CC ₅₀ (µM) ^a	IS ^b	IS ^b
BSF-33	>100	>23.04	>25.38
BSF-37	>100	>43.48	>68.03
BSF-38	>100	>26.53	>56.81
BSF-39	>100	>50.51	>95.23
BSF-40	>100	>50.25	>91.74
BZ	>200	>7.37	>4.17
NFX	>200	>20.96	>20.14

^a Valores de CC₅₀ (µM) representam a concentração do composto que inibe a viabilidade de 50% das células.

^b Índice de Seletividade IS = CC₅₀ de LLC-MK₂/CI₅₀ da cepa. A CI₅₀ para as cepas foi determinada por Fanny Palace-Berl (PALACE-BERL, 2016).

Os dados mostram que os novos compostos apresentam baixa citotoxicidade para células de mamífero, com valores de CC₅₀ (concentração do composto que inibe a viabilidade de 50% das células) acima de 100 µM, a maior concentração dos derivados de NF que pode ser utilizada em função de sua solubilidade. Por outro lado, BZ e NFX foram completamente solubilizados na concentração de 200 µM. A Tabela 7 também mostra o índice de seletividade (IS) para as cepas Silvio e Colombiana, indicando que vários compostos apresentam valores de IS acima de 50. Interessantemente, os valores de IS são sempre maiores para a cepa Colombiana, sugerindo maior suscetibilidade que Silvio.

5.4 Avaliação da atividade tripanocida sobre as formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Em função da baixa citotoxicidade dos novos derivados da NF e de sua atividade contra formas epimastigotas (ver valores de IS na Tabela 7), a atividade tripanocida de três novos compostos (BSF-38, BSF-39 e BSF-40), de c15 e de NFX foi ensaiada contra formas tripomastigotas da cepa Colombiana como descrito em Materiais e Métodos. Os parasitos (10⁶/mL) foram incubados em meio DMEM-2% SFB em presença de 0,5% DMSO por 20 h a 37 °C. Todos os compostos foram ensaiados na concentração final de 1 µM. Para avaliar o efeito do DMSO 0,5%, um controle adicional foi incubado na ausência de composto e de DMSO. A contagem de parasitos foi feita em câmara de Neubauer. Na Tabela 8 apresentamos dados derivados de um único experimento. Verificamos que o número de tripomastigotas totais, incubados com DMSO 0,5%, em ausência de compostos, é cerca de 44% menor em relação a parasitos incubados sem DMSO e sem compostos.

Utilizando como controle os parasitos incubados com DMSO 0,5%, verificamos que, no período de incubação, os novos derivados de NF promovem a mortalidade de 98,5% dos tripomastigotas, ao passo que a mortalidade provocada por NFX é de apenas 7,3%. Os dados foram incluídos no artigo Palace-Berl et al. (2018).

Tabela 8 – Atividade de derivados de NF^a sobre formas tripomastigotas da cepa Colombiana após incubação por 20 h.

	Tripomastigotas (x10⁵/mL)	% Inibição^b
CT	10,3	+51,4
CT+0,5% DMSO	6,8	---
NFX	6,3	7,3
c15	0,2	97,0
BSF-38	0,1	98,5
BSF-39	0,1	98,5
BSF-40	0,1	98,5

^a Concentração de 1 µM.

^b % de Inibição em relação ao Controle + 0,5% DMSO.

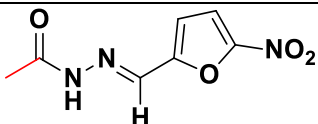
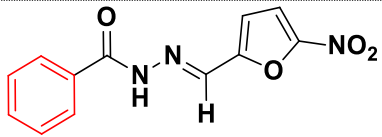
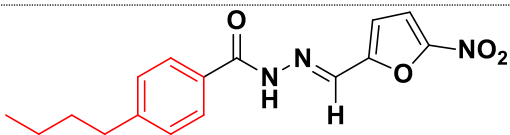
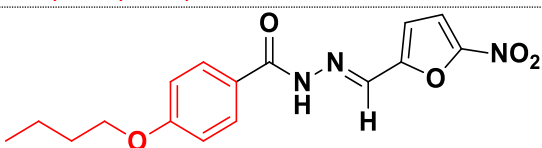
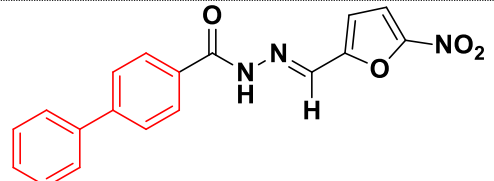
Subsequentemente, a atividade desses compostos foi ensaiada contra formas amastigotas intracelulares com resultados muito promissores, descritos na tese de doutorado (PALACE-BERL, 2016) e em artigo publicado (PALCE-BERL et al., 2018).

5.5 Compostos escolhidos para o estudo

Tendo por base os valores da CI₅₀ para epimastigotas da cepa Silvio e o grau de hidrofobicidade (ClogP), determinado por PALACE-BERL et al. (2015), em nosso projeto de mestrado escolhemos cinco derivados de NF para a caracterização de algumas de suas propriedades. Na Tabela 9, mostra-se a estrutura dos compostos, o valor da CI₅₀ para epimastigotas e o valor de ClogP. Intencionalmente escolhemos compostos com diferentes atividades tripanocidas: compostos com baixa atividade (c1) e com elevada atividade (c5, c15, c19 e c20); e com diferentes graus de hidrofobicidade (ClogP).

Deve ser mencionado que o valor de P indica a tendência preferencial do composto em dissolver-se em uma fase oleosa (lipossolubilidade) ou aquosa (hidrossolubilidade). O logaritmo desse coeficiente é representado por ClogP: quanto maior for o valor de ClogP, mais hidrofóbico é o composto, e quanto menor, mais hidrofílico. Fármacos com valores de ClogP de 7 a 5, tendem a ficar retidos em membranas biológicas; com valores de 2 a -3, têm dificuldade de permear as membranas. Valores de ClogP de 2 a 5 correspondem à faixa recomendada para um fármaco eficaz (MASUNARI, TAVARES, 2006). A análise dos dados

da Tabela 9 indica que os compostos c15, c19 e c20 apresentam valores de ClogP entre 2 e 3,70 e os menores valores de CI_{50} .

Tabela 9 – Características de derivados de NF analisados no estudo			
Composto	Estrutura	CI_{50} μM^a	ClogP^b
c1		23,55 ± 0,63	-0,97
c5		8,71 ± 1,98	0,70
c15		2,73 ± 0,27	2,55
c19		4,20 ± 0,05	2,01
c20		2,84 ± 0,17	3,70

^a Valores de CI_{50} em relação à epimastigotas da cepa Silvio X10 c11.

^b Valores de ClogP calculados a partir do coeficiente de partição n-octanol/água

5.6 Ativação dos derivados da NF pela Nitroredutase de tipo I

Compostos nitroheterocíclicos atuam em geral como pró-drogas, que necessitam ser ativadas para desempenhar seus efeitos citotóxicos. Uma etapa essencial no processo de ativação é a redução do grupo nitro ligado ao anel aromático. Nitroredutases de tipo I, que apresentam como grupo prostético FMN e que são dependentes de NADH, foram implicadas na ativação de BZ e NFX em *T. cruzi* (WILKINSON et al., 2008). Desta forma, decidimos verificar se esta enzima também atuaria na ativação dos derivados de NF.

5.6.1 Obtenção e purificação da Nitroredutase de tipo I de *T. cruzi*

O gene da *TcNTR* codifica uma proteína de 313 aminoácidos. Na porção N-terminal, 11 resíduos de aminoácidos corresponderiam a uma sequência putativa de endereçamento para a mitocôndria (WILKINSON et al., 2008). A porção correspondente ao sítio catalítico

(compreendida entre os resíduos 74 e 313) foi clonada no vetor pTrcHis-C (WILKINSON et al., 2008), que foi gentilmente cedido pelo Dr. Shane Wilkinson (Figura 11A). O plasmídeo recombinante foi transformado em *E. coli* BL21pGRO7, linhagem bacteriana utilizada para a expressão de proteínas recombinantes com elevada estabilidade e enovelamento correto, já que esta linhagem contém o plasmídeo pGRO7 (Figura 11B), que codifica as chaperonas groES e groEL. A expressão das chaperonas foi induzida por L-arabinose e a expressão da TcNTR com 100 μ M de IPTG (ver Materiais e Métodos).

Após ruptura das bactérias, a TcNTR recombinante foi purificada em coluna de Níquel (Ni-NTA, Qiagen). A coluna foi lavada sequencialmente com concentrações crescentes de imidazol (50 mM e 100 mM) e a TcNTR foi eluída com 500 mM de imidazol.

Uma alíquota das amostras referentes ao processo de purificação da TcNTR foi analisada em gel de poliacrilamida-SDS (Figura 13). A enzima recombinante apresenta a massa molecular aparente de 30 kDa (WILKINSON et al., 2008). A concentração de proteína das duas primeiras frações de eluição da TcNTR (Figura 13, canaletas 7 e 8), determinada pelo método de Bradford, é de 1,6 mg/mL e 1,05 mg/mL, respectivamente. Deve ser salientado que a enzima apresenta baixa estabilidade, mesmo sendo armazenada a -80°C em presença de 50% de glicerol.

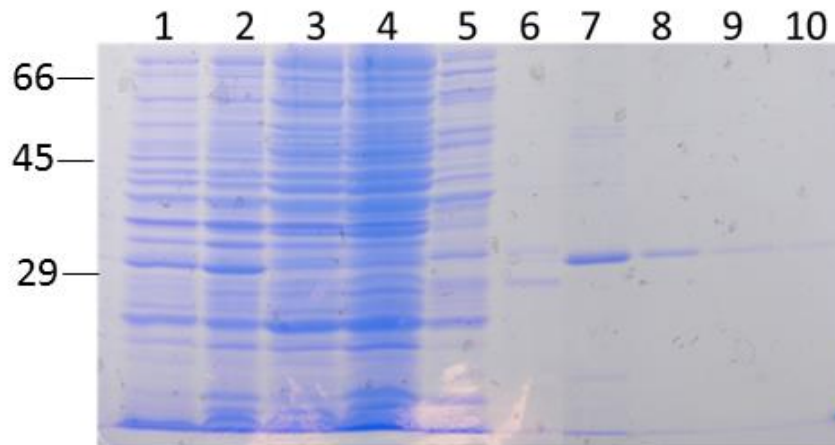


Figura 13 – Análise por eletroforese em gel SDS-PAGE 11% das amostras do processo de purificação da TcNTR. Canaletas: 1- Cultura antes da indução com IPTG; 2- Cultura após indução; 3- Lisado após sonicação; 4- Amostra não ligada à coluna de Níquel; 5- Lavagem com imidazol 50 mM; 6- Lavagem com imidazol 100 mM; 7 a 10 frações eluídas com imidazol 500 mM. Marcadores de massa molecular (kDa) do lado esquerdo da figura.

5.6.2 Padronização das condições para monitorar a atividade da NTR

Visando padronizar as condições para monitorar a atividade da NTR, inicialmente utilizamos a enzima de *E. coli* (Sigma N9284-1MG) e o protocolo descrito por Zenno et al. (1996), com algumas modificações. Nesta abordagem monitora-se a oxidação de NADH a NAD^+ , que ocorre segundo a reação abaixo (equação 03), onde R-NO₂ representa o composto.



A oxidação de NADH é monitorada em espectrofotômetro a 340 nm, de acordo com o espectro de absorção do NADH e NAD^+ mostrado na Figura 14.

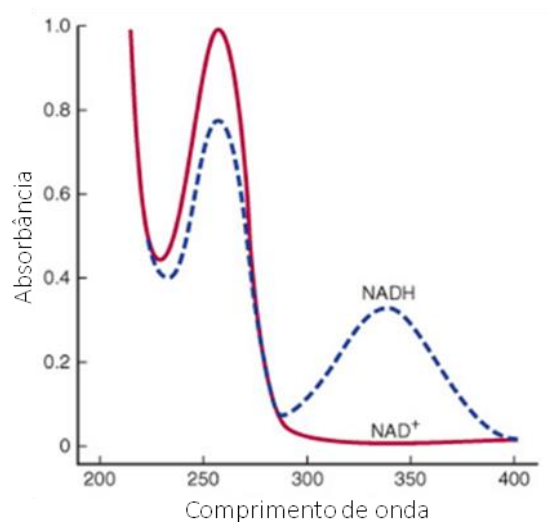


Figura 14 - Espectro da absorção do NAD^+ e do NADH.

A atividade de NTR foi determinada na mistura de reação que continha 50 mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,1 mM NADH; 0,1 mM do aceptor de elétrons (compostos). A reação foi iniciada pela adição de 2 µg da NTR de *E. coli*. A atividade foi monitorada em espectrofotômetro Agilent Cary 60 UV-Vis, no comprimento de onda de 340 nm a 24 °C. Um exemplo da cinética da atividade da NTR sobre o composto c1 é mostrado na Figura 15.

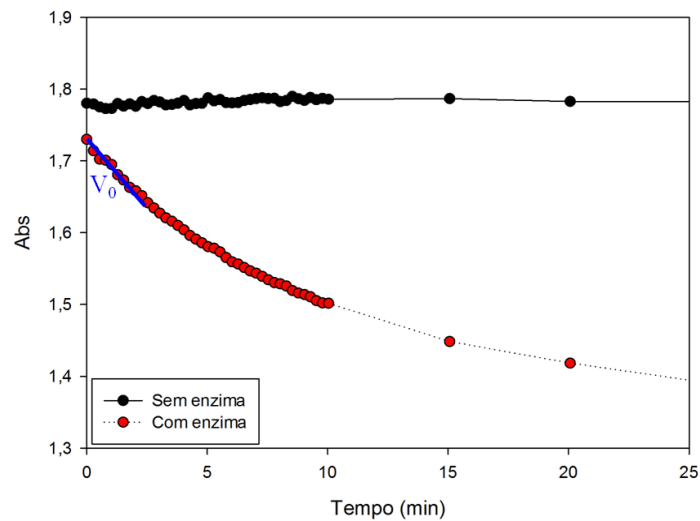


Figura 15 - Cinética da reação da NTR de *E. coli* com o análogo de NF c1. Decaimento da absorbância a 340 nm. V_0 , velocidade inicial, calculada nos tempos indicados.

A velocidade inicial (V_0) foi registrada a cada 15 segundos nos dois primeiros minutos da reação (ver Figura 15). Para calcular a quantidade de NADH oxidado, utilizamos o coeficiente de absorvância molar deste composto $\epsilon_{340} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

A atividade da enzima de *E. coli* foi analisada frente a BZ, NFX, NF e aos derivados de NF, c1, c5 e c15. A atividade específica (*a.e.*) da NTR foi expressa em nmoles de NADH oxidado/min/mg de proteína (Tabela 10). Não foi possível determinar a atividade da NTR frente aos compostos c19 e c20, pois estes, na concentração de 0,1 mM, precipitavam no meio reacional utilizado. Buscando aumentar sua solubilidade, determinamos atividade enzimática de todos os compostos em presença de 0,5% de Triton X100 (Tabela 10). Mesmo nesta condição, não foi possível solubilizar c19 e c20. Por outro lado, verificamos aumento da atividade da NTR para os compostos analisados anteriormente. Um incremento de atividade de 1,7 e 6,9 vezes é observado, respectivamente, para os compostos c1 e c5. Curiosamente, a NTR de *E. coli* apresenta baixa *a.e.* para BZ.

Tabela 10 – Atividade específica da Nitroredutase de <i>E. coli</i> ^a		
Composto	nmoles de NADH oxidado/min/mg	
	Sem Triton-X100	Com Triton-X100 ^b
Benznidazol	12,86	45,01
Nifurtimox	570,73	664,79
Nifuroxazida	627,00	932,40
Composto 1	1696,14	2958,10
Composto 5	393,89	2725,08
Composto 15	418,00	787,70

^a Média de dois ensaios independentes.

^b Concentração final 0,5%.

5.6.3 Atividade da nitroredutase de *T. cruzi* (TcNTR) sobre derivados de NF

A atividade da TcNTR foi determinada nas condições padronizadas no item anterior, utilizando 26 µg da TcNTR purificada na coluna de níquel (Figura 13, Canaleta 7). A velocidade inicial foi determinada como descrito acima. A *a.e.* frente a BZ, NFX, NF e a três derivados de NF foi determinada (Tabela 11). Conforme esperado, não foi possível determinar a atividade da TcNTR frente aos compostos c19 e c20. Em função da limitação da massa de TcNTR, os ensaios não puderam ser realizados na presença de Triton X100.

Tabela 11 – Atividade específica da Nitroredutase de <i>T. cruzi</i> (TcNTR)^a	
Composto	(nmoles de NADH oxidado/min/mg)
Benznidazol	234,60
Nifurtimox	72,96
Nifuroxazida	227,30
Composto 1	153,35
Composto 5	303,80
Composto 15	176,92

^a Média de dois ensaios independentes.

O conjunto dos dados indica que a *a.e.* da enzima de *T. cruzi*, aqui purificada, é menor que a *a.e.* da enzima de *E. coli*. A análise dos dados da Tabela 11 indica que a enzima de *T. cruzi* ativa NF e os compostos c1, c5 e c15, sendo que a taxa de ativação de c5 é cerca do dobro da taxa de ativação de c1 e c15.

Ao longo dos ensaios, observamos que a TcNTR apresenta baixa estabilidade, mesmo quando armazenada a -80 °C em presença de 50% glicerol.

Nova purificação da TcNTR foi realizada visando a determinação dos parâmetros K_m e $V_{máx}$ para os compostos c5 e c15 e NFX. No ensaio, V_0 foi determinada para cada concentração de substrato pelo procedimento mostrado na Figura 15. Na Figura 16 apresentamos os perfis de decaimento da absorbância a 340 nm com diferentes concentrações de c5 (Figura 16A) e gráfico de Lineweaver-Burk com o duplo recíproco de $[S]$ e V_0 (Figura 16B).

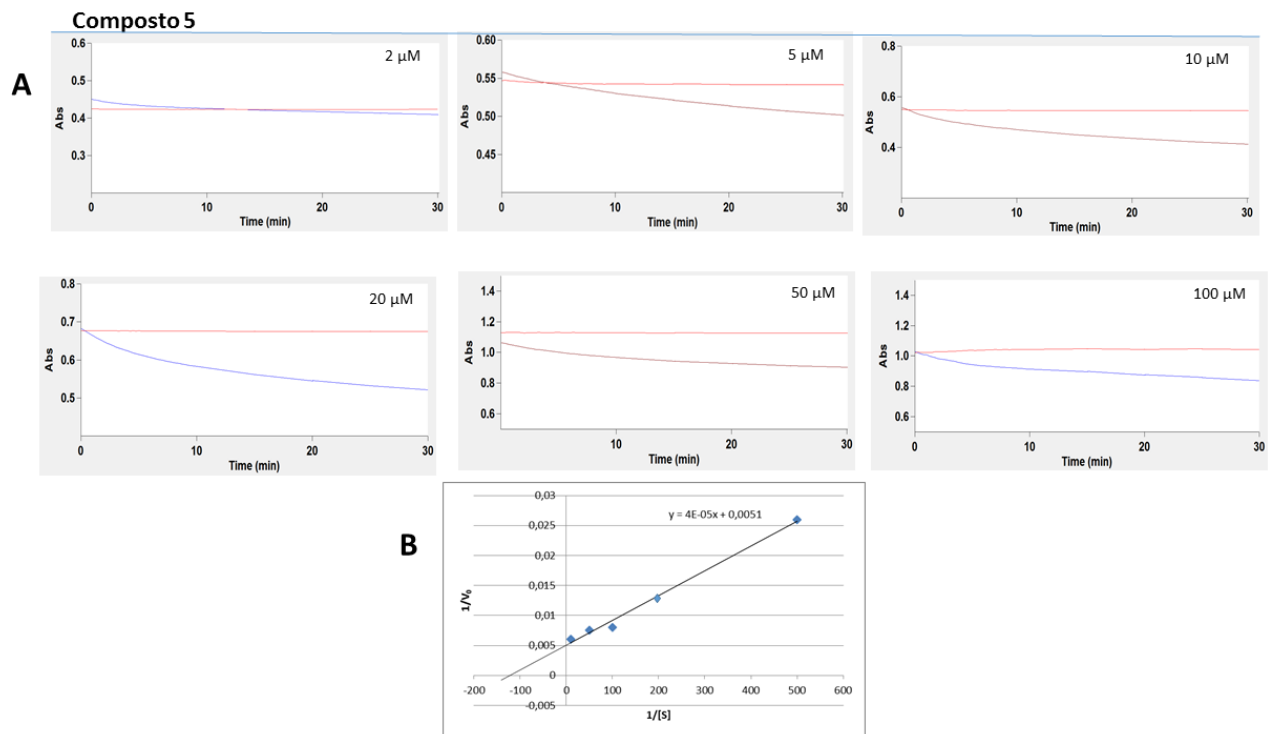


Figura 16 - Determinação dos parâmetros K_m e $V_{m\acute{a}x}$ da $TcNTR$ para o composto c5. (A) Cinética da reação monitorada pelo decaimento da absorvância a 340 nm em diferentes concentrações de substrato. (B) Gráfico de Lineweaver-Burk com o duplo recíproco de $[S]$ e V_0 .

Na Tabela 12 apresentamos os valores de K_m aparente e $V_{m\acute{a}x}$ para os compostos analisados. Os valores representam a média de dois experimentos. A análise dos valores de K_m aparente sugere que a $TcNTR$ teria maior afinidade para c5 do que para c15 e NFX. Os valores também estariam condizentes com os valores de *a.e.* da enzima para os mesmos compostos (Tabela 11). Por outro lado, deve ser lembrado que a atividade enzimática está sendo determinada *in vitro*, em meio reacional aquoso, utilizando apenas o sítio catalítico da enzima. De acordo com os valores de ClogP (Tabela 9), o composto c5 é mais hidrofílico que c15, o que poderia explicar a maior afinidade e maior velocidade de reação da $TcNTR$.

Tabela 12 – Valores de $K_{m\ ap}$ e V_{max} da $TcNTR$ para NFX e derivados da NF.

Composto	V_{max} (nmol/min)	$K_{m\ ap}$ (μM)
NFX	76,92	92,30
c5	124,30	7,95
c15	40,00	30,25

5.7 Cinética de captação dos compostos

Para determinar o acúmulo intracelular de compostos, várias técnicas se baseiam em medidas da fluorescência ou medidas da radioatividade dos mesmos (MORTIMER, PIDDOCK, 1991; WILLIAMS, PIDDOCK, 1998; PIDDOCK et al., 1999). No entanto, essas técnicas não podem ser aplicadas para compostos que não possuem fluorescência ou para os quais análogos radioativos não estão disponíveis, como é o caso dos derivados de NF. Em bactéria, foi estabelecido um protocolo para medir a captação de compostos, baseado no monitoramento da redução da concentração dos mesmos no meio extracelular (ZHOU et al., 2015). Protocolo análogo foi utilizado por Boiani e colaboradores (2010) para determinar a captação de NFX e de compostos heterocíclicos em *T. cruzi*. Em Materiais e Métodos descrevemos o protocolo adotado para determinar a captação de derivados de NF, que integra os procedimentos descritos por Boiani et al. (2010) e Zhou et al. (2015). A quantidade de composto interiorizada pelos parasitos foi calculada a partir da redução da absorbância do meio em relação ao valor de absorbância no tempo zero, levando em conta o valor da absorvidade molar do composto (ϵ).

5.7.1 Espectro de absorção e coeficiente de absorvidade molar dos compostos

Visando determinar o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) dos compostos, que corresponde à capacidade que um mol de uma determinada substância possui em absorver luz a um determinado comprimento de onda, determinamos o espectro de absorção de NFX e dos derivados de NF. Os espectros foram determinados em tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 em presença de 1% de DMSO, com os compostos na concentração de 100 μ M (Figura 17). Verificamos que NFX e os compostos c1, c5 e c15 apresentam um pico de absorção bem definido na região de 365 a 400 nm. Por outro lado, nesta região, o composto c19 apresenta um pico de absorção pouco definido e que é ausente em c20. Observa-se ainda que na região de 365 a 400 nm, NFX, c1 e c5 apresentam um valor de Absorbância de 2 a 2,3, ao passo que, para os compostos c15 e c19, os valores de absorbância em 380 nm são, respectivamente, 0,6 e 0,46. Isto refletiria a menor solubilidade desses derivados em relação a c1 e c5, no meio utilizado.

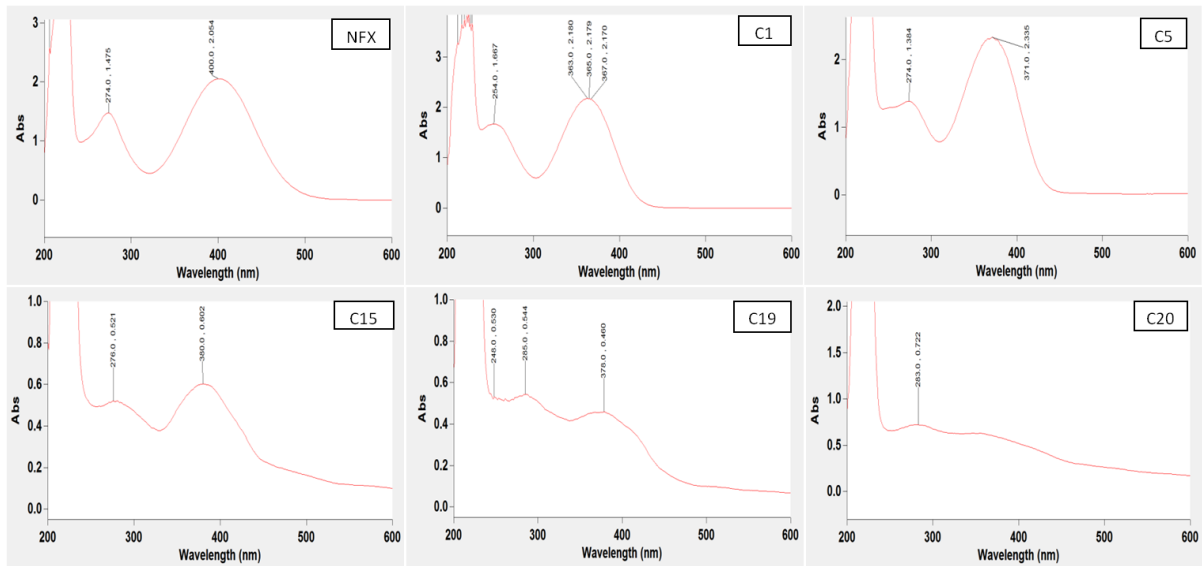


Figura 17 - Espectro de absorção dos compostos na concentração de 100 µM em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 + 1% DMSO.

Com base no valor da absorbância no comprimento de onda de absorção máxima, determinamos o coeficiente de absortividade molar (ϵ) dos compostos (Tabela 13). Observa-se que o valor de ϵ é semelhante para os compostos c1, c5 e NFX. No entanto, para c15 e c19, o valor de ϵ é bem menor e para c20 não foi possível determiná-lo, indicando que nas condições do ensaio a solubilidade desses compostos é baixa.

Tabela 13 - Coeficiente de absortividade molar (ϵ) em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0.		
Composto	Comprimento de onda (nm)^a	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)
Nifurtimox	400 nm	20.538,79
c1	365 nm	21.791,07
c5	371 nm	23.353,52
c15	380 nm	6.022,56
c19	378 nm	4.597,37
c20	---	---

^a Comprimento de onda que se verifica o maior valor de Absorbância

Tendo em vista que o ensaio de captação dos compostos é feito em meio A/G, meio que contém 10 mM de glicose (ver Material e Métodos) e em função da baixa solubilidade de c15, c19 e c20, o espectro dos compostos, na concentração de 50 µM, foi determinado em meio A/G em presença de 1% DMSO (Figura 18). Os dados indicam que os compostos c15, c19 e c20 continuam com baixa solubilidade nesta condição.

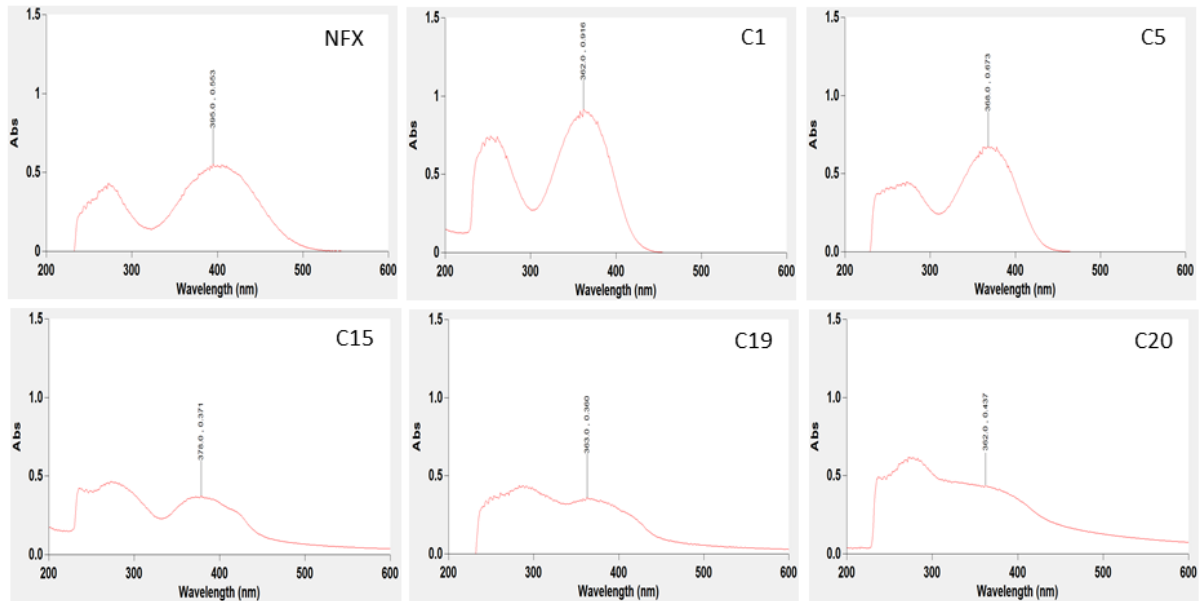


Figura 18 - Espectro de absorção dos compostos na concentração de 50 μM em meio A/G + 1% DMSO.

Na tentativa de contornar o problema da baixa solubilidade dos compostos que apresentam elevado grau de hidrofobicidade (ver valores de ClogP na Tabela 9) e considerando que esses compostos apresentam elevada atividade tripanocida quando ensaiados em meio LIT-10% de SFB, decidimos adicionar 10 mg/mL de soroalbumina bovina (BSA) ao meio A/G. No soro fetal bovino, estima-se haver de 3,2 a 7 g/100 mL de proteína total (PRICE, GREGORY, 1982), o que, no meio contendo 10% de soro, corresponderia a 3,2 a 7 mg/mL de proteína total.

O espectro dos compostos na concentração de 50 μM foi determinado em meio A/G + BSA com 1% DMSO final (Figura 19). Os dados mostram que houve aumento da solubilidade de c15, c19 e c20.

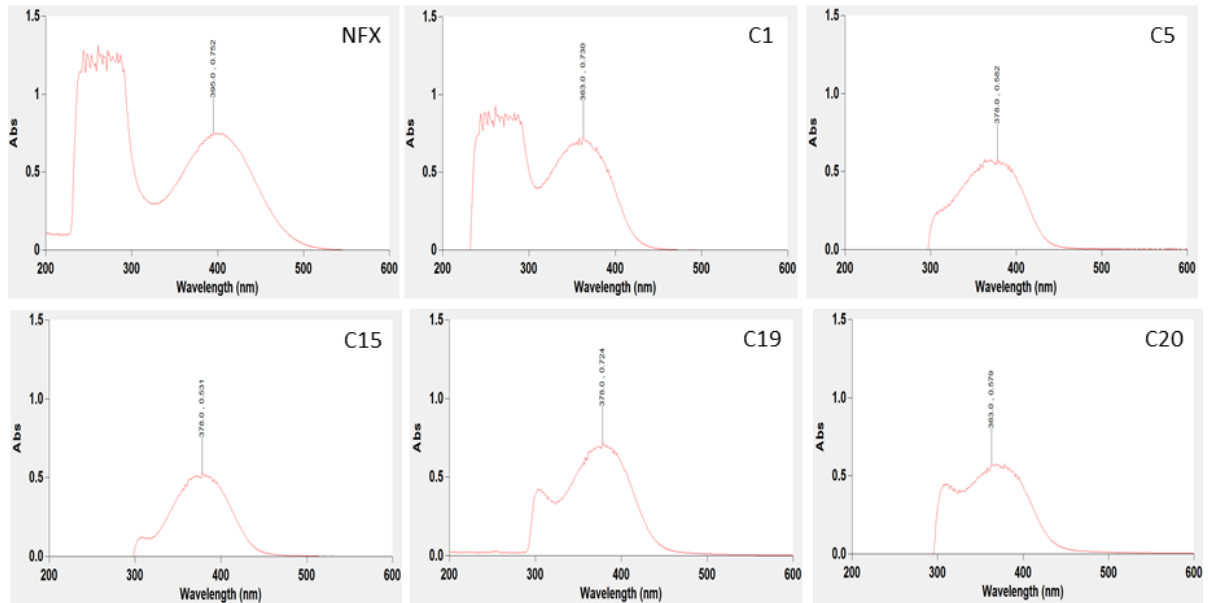


Figura 19 - Espectro de absorção dos compostos na concentração de 50 μM em meio A/G + BSA com 1% DMSO final.

Com base no valor da absorbância obtido no comprimento de onda de absorção máxima, determinamos o coeficiente de absorvidade molar (ϵ) dos compostos (Tabela 14). Os dados indicam que nesta condição, os derivados de NF apresentam valores de ϵ próximos, ao contrário do observado em Tris-HCl 50 mM, pH 7,0 + 1% DMSO (Tabela 13).

Tabela 14 - Coeficiente de absorvidade molar (ϵ) em meio A/G + BSA +1% DMSO		
Composto	Comprimento de onda^a (nm)	ϵ ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)
Nifurtimox	395	15.040,00
c1	363	14.600,00
c5	378	11.640,00
c15	378	10.620,00
c19	378	14.480,00
c20	363	11.580,00

^a Comprimento de onda em que se verifica o maior valor de Absorbância

Que seja de nosso conhecimento, poucos trabalhos relatam a ligação a proteínas do soro de fármacos utilizados para kinetoplastídeos patogênicos. Em um estudo sobre a distribuição de NFX na barreira hematoencefálica de camundongos saudáveis e infectados com *T. brucei* foi descrito que 39% do fármaco se liga a proteínas do plasma humano (JEGANATHAN et al., 2011). Em formas epimastigotas de *T. cruzi* foi investigado o processo de endocitose, utilizando-se albumina e transferrina como substratos (BATISTA et al., 2015). Os autores concluíram que nos parasitos a interiorização da albumina ocorre por endocitose (independente de clatrina) via membrana da bolsa flagelar. Desta forma, tendo em

vista o incremento da solubilidade dos derivados de NF na presença de BSA, nos ensaios de captação dos compostos esta proteína foi adicionada no meio de incubação A/G.

5.7.2 Cinética de captação dos compostos por formas epimastigotas

As condições experimentais para avaliar a cinética de captação dos compostos por formas epimastigotas são descritas em Materiais e Métodos. Os parasitos foram incubados a 4 °C e a 28 °C em meio A/G + BSA + 1% DMSO, na presença de 50 µM dos compostos. Em diferentes tempos, os parasitos foram centrifugados e a absorbância do sobrenadante foi monitorada no comprimento de onda de absorbância máxima de cada composto (Tabela 14). A partir do coeficiente de absorvidade molar, foi calculada a concentração dos compostos, que, subtraída da concentração inicial no meio (tempo zero), forneceu a quantidade de composto captada pelos parasitos.

5.7.2.1 Estabilidade dos derivados de NF

Antes de realizar os ensaios de captação, avaliamos a estabilidade dos compostos nas condições reacionais, mas na ausência de parasitos. Na Tabela 15 apresentamos os dados da estabilidade de NFX e BZ a 4 °C e 28 °C. Observa-se que, após 120 minutos de incubação, houve redução de cerca de 1 nmol de cada composto em ambas as temperaturas.

Tempo (min)	NFX ^b		BZ ^b	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
30	0,26	0,31	0,16	0,52
60	1,12	0,93	0,10	0,46
90	1,12	0,69	0,64	1,02
120	1,48	1,12	1,10	0,97

^aConcentração inicial de NFX e BZ 50 µM.

^bQuantidade cumulativa de composto degradado. Valores em nmoles.

Na Tabela 16, apresentamos os dados da estabilidade dos derivados de NF a 4 °C e 28 °C. Para os compostos c1, c5 e c15 verifica-se que, após 120 min de incubação, houve redução de 0,5 a 4 nmoles dos compostos no meio de cultura em ambas as temperaturas. Por outro lado, para os compostos c19 e c20 o desaparecimento do composto do meio é mais intenso, chegando a 8 nmoles, independente da temperatura de incubação (ver Discussão).

Tabela 16 - Estabilidade de derivados de NF ^a a 4 °C e 28 °C na ausência de parasitos ^b										
Tempo (min)	4 °C					28 °C				
	c1	c5	c15	c19	c20	c1	c5	c15	c19	c20
30	1,31	1,43	0,22	4,46	2,61	0,68	0,19	0,71	1,35	3,02
60	0,74	1,51	0,16	1,92	1,21	0,18	0,34	0,63	3,97	5,61
90	1,61	0,04	0,53	5,77	4,06	0,39	3,17	0,73	1,23	6,73
120	2,54	0,54	1,27	4,66	8,20	1,14	4,08	2,07	2,65	8,03

^a Concentração inicial 50 µM

^b Quantidade cumulativa de composto que é removido do meio de cultura. Valores em nmoles.

5.7.2.2 Captação dos derivados de NF por formas epimastigotas em duas temperaturas de incubação

Foi determinada a cinética de captação de NFX e dos derivados de NF por epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 a 4 °C (Figura 20) e a 28 °C (Figura 21). Os dados representam a média e desvio padrão de três ensaios independentes. Os dados levam em conta a degradação ou desaparecimento dos compostos do meio de cultura em ausência de parasitos.

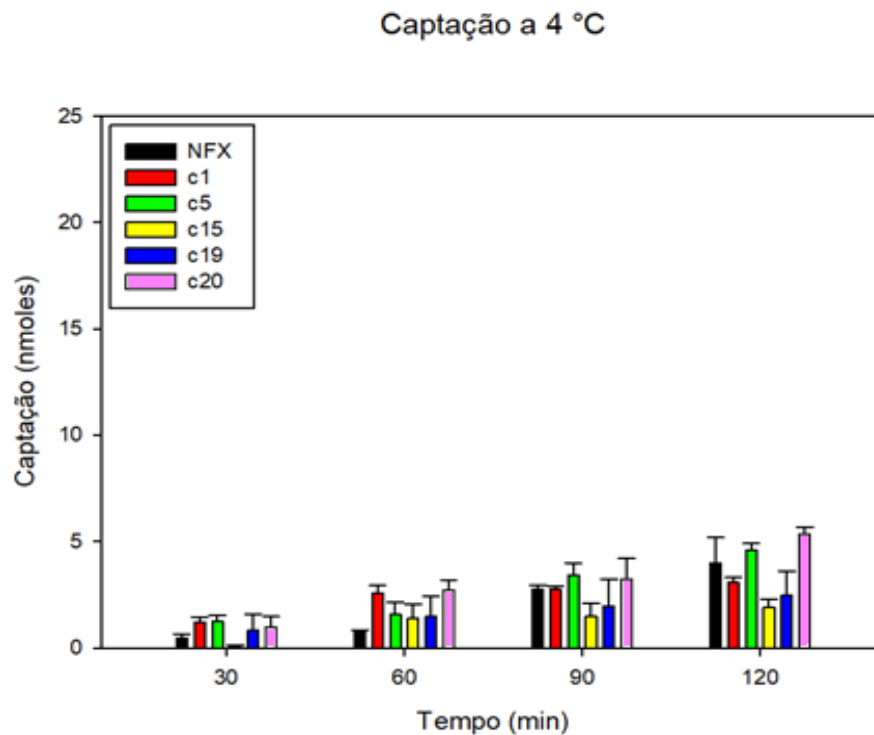


Figura 20 - Captação de NFX e de derivados de NF por 10^8 formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 a 4 °C. Média e desvio padrão de três réplicas biológicas.

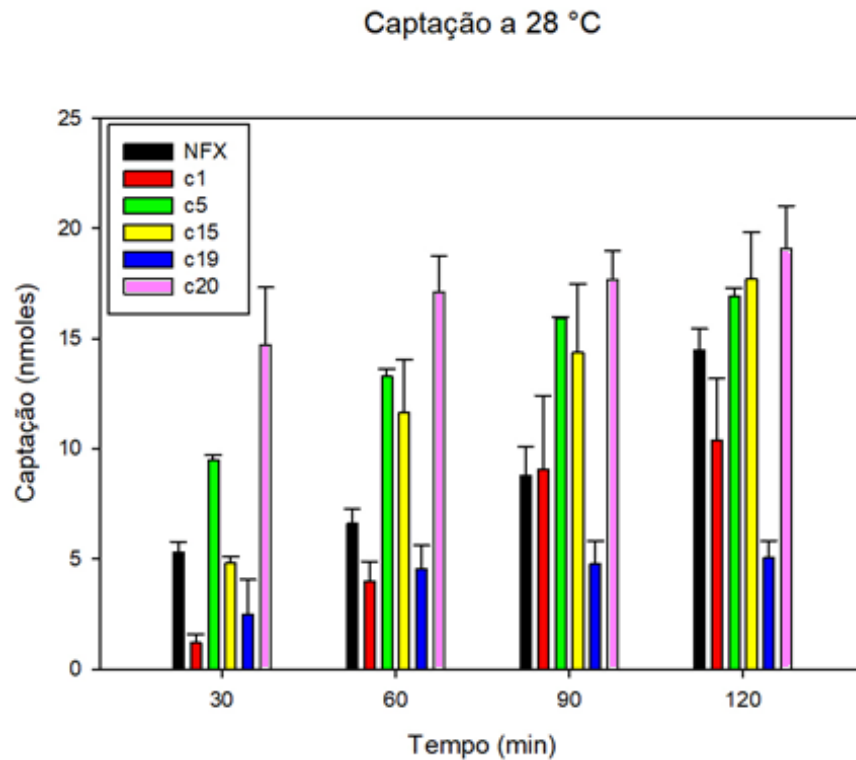


Figura 21 - Captação de NFX e de derivados de NF por 10^8 formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 a 28 °C. Média e desvio padrão de três réplicas biológicas.

A cinética de captação de cada composto é apresentada na Figura 22. Observa-se que as cinéticas variam entre os compostos. A cinética de captação de c5 e c20 é bifásica: a velocidade inicial é rápida, possivelmente relacionada ao equilíbrio dos derivados entre a fase aquosa e a membrana do parasito, seguida por uma taxa de captação mais lenta.

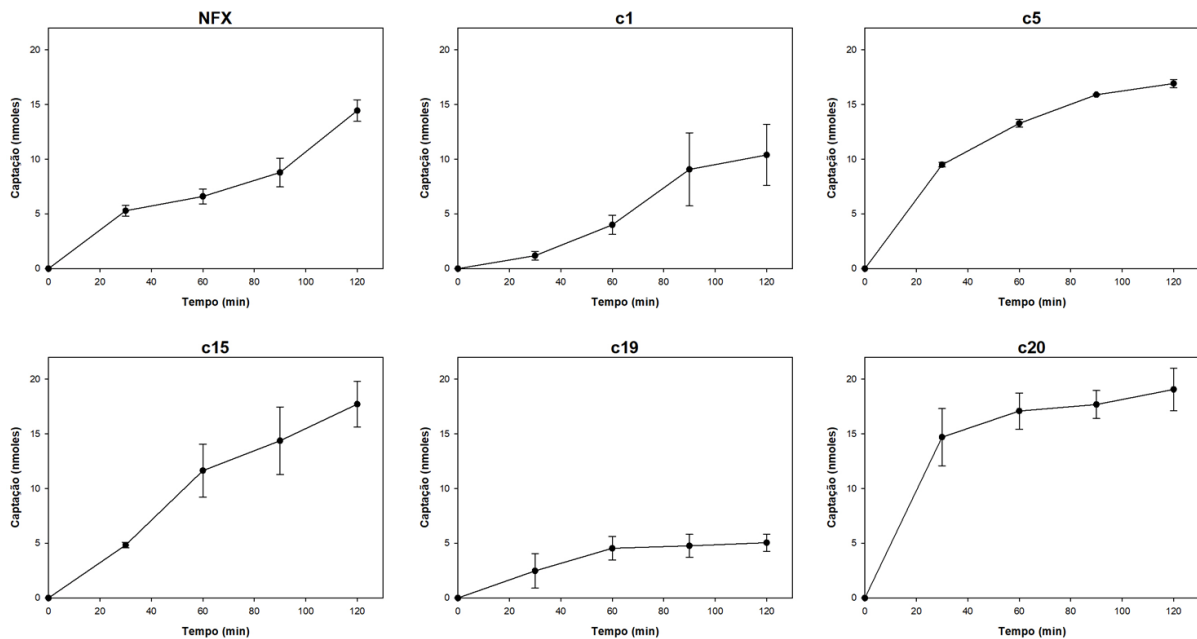


Figura 22 – Cinética de captação de NFX e de derivados de NF por 10^8 formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 a 28 °C. Média e desvio padrão de três réplicas biológicas.

Observamos ainda diferenças nítidas na quantidade de compostos interiorizado a 4 °C e a 28 °C (Figura 20 e 21). Na Tabela 17 apresentamos os dados referentes à quantidade cumulativa de composto captado após 2h de incubação nas duas temperaturas.

Tabela 17 – Quantidade de NFX e de derivados da NF captados após 2 h de incubação^a

Composto	Captação (nmoles) ^b		Razão da captação 28 °C / 4 °C
	28 °C	4 °C	
NFX	14,45 ± 0,99	3,96 ± 1,22	3,65
c1	10,39 ± 2,78	3,07 ± 0,25	3,38
c5	16,92 ± 0,37	4,60 ± 0,30	3,68
c15	17,72 ± 2,10	1,90 ± 0,41	9,33
c19	5,05 ± 0,78	2,46 ± 1,16	2,05
c20	19,07 ± 1,95	5,36 ± 0,31	3,56

^a Concentração inicial 50 µM.

^b Captação de composto por 10^8 formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 (Média e desvio padrão de três réplicas biológicas).

O conjunto dos dados indica que os compostos c5, c15 e c20 apresentam as maiores taxas de captação por 10^8 epimastigotas (~17 nmoles em média), que por sua vez é levemente superior à taxa de captação de NFX (~14 nmoles). O composto c19 apresenta a menor captação pelos parasitos (5,05 ± 0,78 nmoles). Verifica-se ainda que a interiorização dos compostos c1, c5, c20 e NFX a 28 °C é, em média 3,5 vezes maior que a 4 °C. São exceções os compostos c15 e c19, para os quais a razão de captação 28 °C/4 °C é, respectivamente, 9 e 2.

5.7.2.3 Captação dos derivados de NF por formas epimastigotas em presença de inibidores da síntese de ATP

Conforme mencionado acima, nos ensaios de captação BSA foi adicionada ao meio de incubação, o que poderia ocasionar a adsorção dos derivados à proteína. Batista et al. (2015) reportaram que BSA seria interiorizada em epimastigotas de *T.cruzi* por endocitose via membrana da bolsa flagelar e que o processo de interiorização seria 200 vezes mais eficiente a 28 °C do que a 4 °C. Desta forma, a captação dos derivados de NF não deve estar ocorrendo adsorvidos à BSA, via bolsa flagelar, uma vez que sua interiorização é cerca de 3,5 vezes maior a 28 °C do que a 4 °C.

Para investigar se os compostos poderiam ser interiorizados por transporte ativo, repetimos o ensaio de captação na presença de inibidores da síntese de ATP. Utilizamos 2-deoxiglicose (dG) na concentração de 10 mM, para a inibição da síntese via glicólise, e 5 mM de azida sódica (NaN_3) para inibir a produção de ATP via fosforilação oxidativa (SCHENKMAN, ROBBINS, NUSSENZWEIG, 1991; DE SOUZA, DE CARVALHO, 2013).

Inicialmente investigamos se os dois inibidores, nas concentrações acima, causavam morte dos parasitos. Para isto, formas epimastigotas da cepa Silvio X10 cl1, na concentração de 80×10^6 células/mL, foram divididas em duas alíquotas e incubadas em meio A/G + BSA ou em meio A + 10 mM dG + 5 mM NaN_3 + BSA, de acordo com o esquema abaixo (Figura 23). Após 1 h de incubação a 28 °C, os parasitos foram transferidos para 4 °C e 28 °C e sua concentração foi aferida por contagem em câmara de Neubauer após diferentes tempos de incubação (Tabela 18).

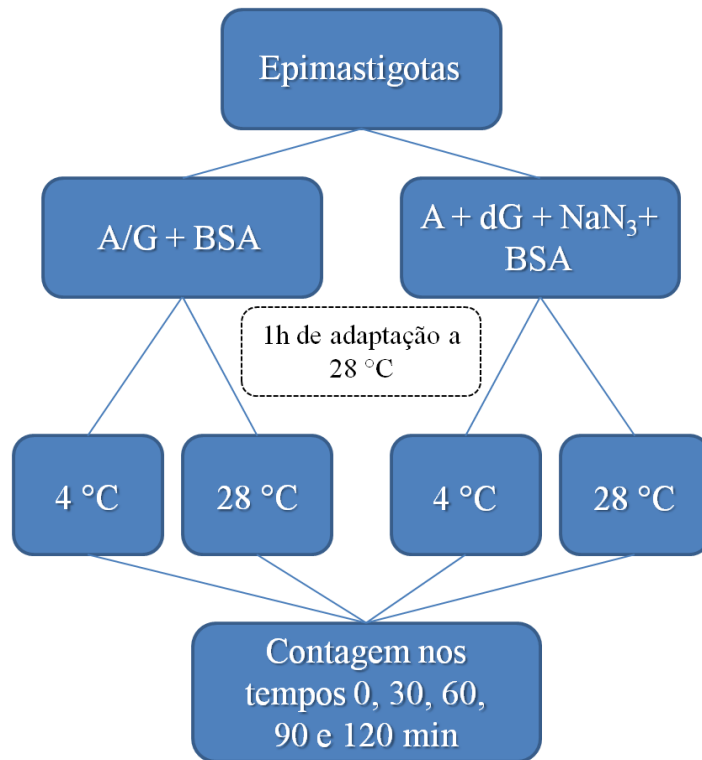


Figura 23 - Esquema do ensaio em presença dos inibidores de ATP.

Meio A/G = NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂HPO₄ 15 mM; Glicose 10 mM + 10 mg/mL BSA
 Meio A = NaCl 0,14 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄ 8 mM; KH₂HPO₄ 15 mM + 2-deoxiglicose (dG) 10 mM +
 Azida sódica (NaN₃) 5 mM + 10 mg/mL BSA

Tabela 18 – Concentração de epimastigotas (x10⁶/mL)

Tempo (min)	Meios			
	A/G + BSA		A + dG + NaN ₃ + BSA	
	4 °C	28 °C	4 °C	28 °C
0	61	73	51	61
30	59	71	53	62
60	57	73	52	58
90	58	64	43	56
120	56	68	45	55

Considerando-se a concentração inicial dos parasitos (80×10^6 células/mL) verifica-se que a pré-incubação de 1 h a 28 °C, visando a adaptação aos novos meios de cultura, promoveu a morte de 9% e 23,7% das células incubadas, respectivamente, em meio A/G e A + dG + NaN₃ (tempo zero, Tabela 18). Após 120 min de incubação a 28 °C, a morte cumulativa de epimastigotas, em relação à concentração inicial de 80×10^6 células/mL, foi de 15% (meio A/G) e 31% (meio A + dG + NaN₃). Observamos que os parasitos vivos se movem muito lentamente no meio com os inibidores da síntese de ATP.

Em ensaio descrito adiante (item 5.9.2), comprovamos que dG e NaN_3 inibiram a síntese de ATP. Desta forma, investigamos a taxa de captação de NFX e dos derivados de NF em ausência e em presença de inibidores da síntese de ATP (Tabela 19).

Tabela 19 – Efeito de inibidores da síntese de ATP na captação de compostos após incubação por 2 horas a 28 °C

Composto	Captação (nmoles) ^a	
	A/G	A + dG + NaN_3
NFX	18,80	7,91
c1	9,71	4,36
c5	12,07	5,62
c15	12,2	5,81
c19	7,44	3,67
c20	16,67	13,73

^a Captação de composto por 10^8 formas epimastigotas. (Média de duas réplicas).

Observa-se que a captação dos compostos em presença de inibidores da síntese de ATP é em média 2 vezes menor do que em sua ausência.

5.8 Efeito dos derivados de NF na atividade desidrogenásica

Heterociclos contendo N-óxido constituem um grupo de novos agentes tripanocidas promissores (BOIANI et al., 2010). Este grupo de compostos e alguns derivados de benzofuroxano promovem a inibição acentuada da atividade desidrogenásica total de *T. cruzi* ao contrário do que se verifica com NFX (BOIANI et al., 2010). Utilizando a mesma abordagem experimental usada por esses autores, baseada no ensaio do MTT (ver Material e Métodos), investigamos o efeito de NFX e derivados de NF na atividade desidrogenásica total de epimastigotas da cepa Silvio X10 c11. Neste ensaio, os compostos foram incubados na concentração única de 50 μM . A atividade desidrogenásica foi medida no tempo zero e após 2 h de incubação (Figura 24). Ressalta-se que os valores apresentados na Figura correspondem à atividade enzimática determinada após uma incubação adicional de 2,5 h com MTT. Assim o tempo total de exposição aos compostos é de 2,5 h (para o tempo zero) e 4,5 h (para o tempo 2 h).

Tomando por base parasitos controle, incubados na ausência de composto, observa-se que os derivados de NF apresentam baixa inibição da atividade desidrogenásica após 2 h de incubação (4,5 h total). Os compostos c15, c19 e c20 apresentam a redução mais pronunciada,

da ordem de 20%. Por sua vez, NFX promoveu uma inibição de 14%, corroborando os resultados reportados por Boiani et al. (2010).

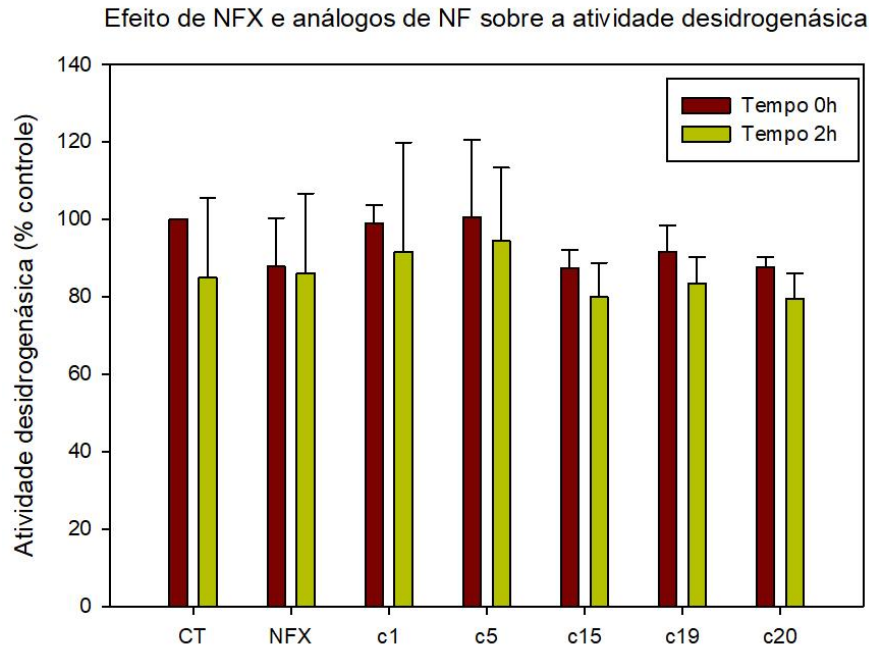


Figura 24 - Efeito do NFX e dos derivados de NF sobre a atividade desidrogenásica total de formas epimastigotas. Nota: aos tempos de incubação devem ser acrescidas 2,5 h de incubação com MTT.

5.9 Efeito dos derivados de NF no consumo de oxigênio

5.9.1 Comparação entre os meios reacionais SRM e A/G

Habitualmente, os ensaios de consumo de oxigênio são realizados em meio reacional intracelular padrão SRM (sacarose 125 mM; KCl 65 mM; Hepes 10 mM, pH 7,2; MgCl₂ 1 mM; KH₂PO₄ 2 mM e EGTA 0,5 mM). Uma vez que em nossos ensaios utilizamos rotineiramente o meio A/G + BSA 10 mg/mL, comparamos o consumo de oxigênio em formas epimastigotas intactas (ou seja, não permeabilizadas com digitonina) das cepas Silvio X10 c11 e Colombiana nos dois meios, em presença de 1% DMSO (Figura 25).

Os dados mostram um consumo de oxigênio maior no meio A/G em relação a SRM. Mostram ainda que no meio A/G a cepa Silvio X10 c11 apresenta um consumo de oxigênio 35% maior que Colombiana. Desta forma o meio A/G foi utilizado nos ensaios subsequentes.

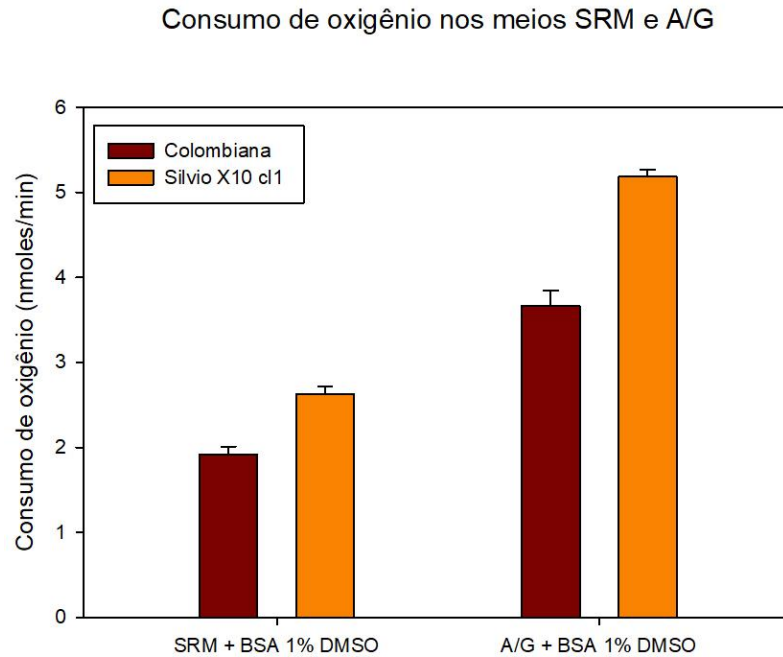


Figura 25 - Consumo de oxigênio por epimastigotas das cepas Colombiana e Silvio X10 cl1 nos meios reacionais SRM e A/G. (Média de dois ensaios).

5.9.2 Efeito de inibidores da síntese de ATP no consumo de oxigênio

Para avaliar o efeito de inibidores da síntese de ATP (dG e NaN_3) no consumo de oxigênio, uma cultura de Silvio X10 cl1 em LIT 10% SFB, em fase exponencial de crescimento, foi centrifugada e ressuspensa em meio A/G + BSA 10 mg/mL ou A + 10 mM dG + 5 mM NaN_3 + BSA 10 mg/mL por 60 min (ver Figura 22). O consumo de oxigênio foi determinado após 0, 30 e 60 min, como descrito em Materiais e Métodos (Figura 26). Após 60 min de reação, os parasitos incubados em meio A/G apresentam consumo de oxigênio 30 vezes maior do que parasitos incubados com os inibidores da síntese de ATP, comprovando a atividade inibitória destes.

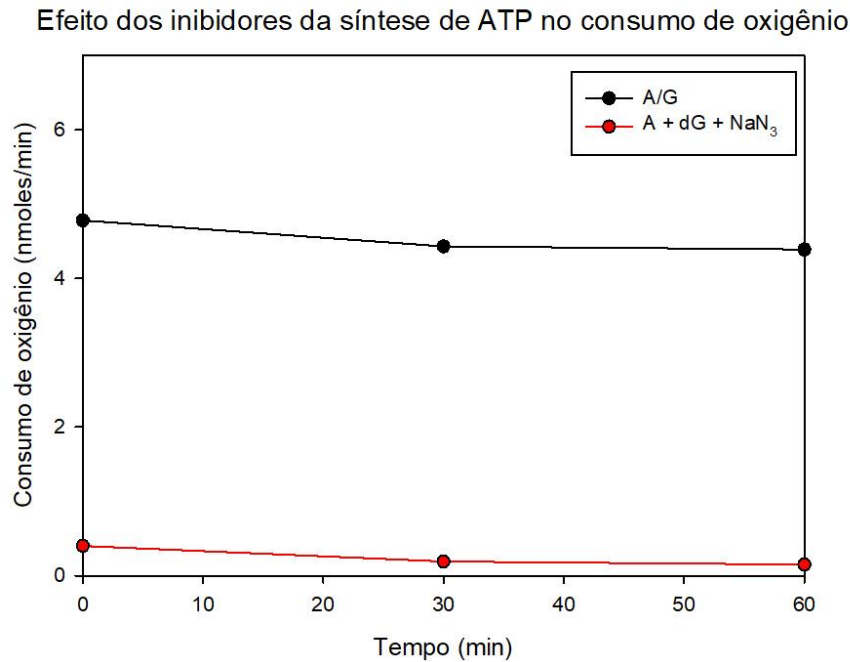


Figura 26 - Efeito dos inibidores da síntese de ATP no consumo de oxigênio por epimastigotas intactos da cepa Silvio X10 c11.

5.9.3 Efeito dos derivados de NF no consumo de oxigênio

Em seguida, determinamos o efeito de NFX e dos derivados de NF no consumo de oxigênio de formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11. Os ensaios foram realizados em meio A/G + BSA 10 mg/mL e os compostos foram adicionados na concentração de 50 μ M em presença de DMSO 1%. Na Tabela 20 apresentamos os valores da inibição do consumo de oxigênio promovida pelos compostos em relação ao controle, após 2 h de exposição a 28 °C.

Tabela 20 – Inibição do consumo de oxigênio de formas epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 por NFX e derivados de NF^a

	Porcentagem de inibição em relação ao controle ^b
NFX	12,96
c1	0
c5	6,48
c15	51,28
c19	22,08
c20	58,48

^a Concentração dos compostos 50 μ M.

^b 2h de incubação a 28 °C. Média de dois ensaios.

Os compostos c15 e c20 apresentam o maior efeito inibitório no consumo de oxigênio (50 a 60%), seguidos pelos compostos c19 (22%) e c5 (6,5%). Nos ensaios, c1 não promoveu

nenhuma inibição do consumo de oxigênio. Os compostos c15, c19 e c20 apresentam efeito inibitório maior que NFX (13%).

5.10 Efeito dos compostos na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) mitocondrial

Na ativação de nitrocompostos por nitroredutases de tipo II propõe-se a formação de um radical nitro instável, que, na presença de oxigênio, determina a formação do íon superóxido (O₂⁻) e a regeneração do pró-fármaco, num processo conhecido como ciclo redox (“*redox cycling*”) (PATTERSON, WYLLIE, 2014). O íon superóxido, pela ação da superóxido dismutase, gera peróxido de hidrogênio (H₂O₂), que, pela reação de Haber-Weiss na presença de íons FeIII, formaria o radical hidroxila (ver Introdução). Desta forma, para nitrocompostos que atuam via ciclo redox esperar-se-ia o aumento do consumo de oxigênio e da produção de H₂O₂.

Para NFX, estudos anteriores com formas epimastigotas de *T. cruzi* reportaram dados contraditórios. Enquanto Giulivi et al. (1988) descrevem estimulação da liberação de H₂O₂ para o meio extracelular, Boiani e colaboradores (2010) não observam este efeito usando 25 µM NFX.

Em nosso estudo, investigamos o efeito dos derivados de NF na produção e liberação de H₂O₂ para o meio. A concentração do peróxido de hidrogênio foi determinada como descrito em Materiais e Métodos, utilizando-se *Amplex red* e HRP (*horseradish peroxidase*). Esta concentração foi determinada a partir de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de H₂O₂ recém-preparada (dados não mostrados).

Nos ensaios, uma suspensão parasitária de 5 x 10⁷ células/mL (aproximadamente 1 mg de proteína/mL) foi incubada com os derivados de NF e com NFX (na concentração de 50 µM). Como controle foi incluída a Menadiona (5 µM), fármaco de comprovada atividade via ciclo redox (BOIANI et al., 2010). Após 30 min de exposição aos compostos, os parasitos foram centrifugados e a concentração de H₂O₂ foi determinada no sobrenadante (Tabela 21). Observa-se que os derivados c1, c15 e NFX não promovem a produção de H₂O₂. A quantidade de H₂O₂ induzida pelo composto c20 é cerca de 800 vezes menor do que aquela obtida pós-incubação com Menadiona.

Tabela 21 – Efeito de compostos na produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂).

Composto^a	Produção de H₂O₂ (nM) (média ± d.p.)
Controle	0 ± 0
c1	0 ± 0
c15	0,018 ± 0,009
c20	0,072 ± 0,045
NFX	0 ± 0
Menadiona	56 ± 5,65

^aConcentrações utilizadas: derivados de NF e NFX, 50 µM; Menadiona, 5 µM.

5.11 Efeito dos compostos sobre o DNA

Em estudos anteriores foi mostrado que a exposição de formas epimastigotas de *T. cruzi* a radiação ionizante (500 Gy) (REGIS-DA-SILVA et al., 2006) ou a Benznidazol (240 µM) (RAJÃO et al., 2014) ocasionava extensa quebra do DNA que era evidenciada pelo padrão de migração em PFGE. Seguindo os procedimentos descritos pelos autores, culturas em fase exponencial da cepa Silvio X10 c11, em meio LIT-10% SFB, foram expostas, por 48 h a 28 °C, aos seguintes compostos: BZ (240 µM), NFX (48 µM), NF (300 µM) e o análogo de NF c15 (24 µM). As concentrações utilizadas correspondem a 8 vezes o valor da CI₅₀ dos compostos. Ao término da incubação, as culturas foram lavadas 3 vezes com PSG (Solução Salina com Glicose, tamponada com fosfato) (CANO et al., 1995). Os parasitos vivos foram contados, ressuspensos em PSG na concentração de 10⁸/mL e incluídos em blocos de agarose de baixa temperatura de fusão. A PFGE foi realizada nas condições descritas em Materiais e Métodos. Ao término da corrida as bandas cromossômicas foram evidenciadas por coloração com brometo de etídio (Figura 27). O padrão de bandas indica extensa degradação do DNA do parasito, após exposição a BZ, NF e c15, em relação ao Controle incubado em ausência de compostos. É interessante notar que a incubação com NFX, na concentração utilizada não promoveu quebras do DNA.

Após padronização das condições experimentais, investigamos o efeito do tempo de incubação com os derivados de NF no padrão de fragmentação do DNA. Para esta finalidade, os parasitos foram incubados com c1 (160 µM), c15 (24 µM) e c20 (24 µM) por 24 h ou 48 h a 28 °C (Figura 28). Observa-se que o rastro do DNA aumenta com o tempo de incubação. O padrão de migração do DNA obtido por incubação com os derivados por 48h é semelhante àquele obtido por incubação com BZ (240 µM) e NF (300 µM) no mesmo período. Os dados confirmam ainda que NFX (48 µM) não promove quebras apreciáveis no DNA.

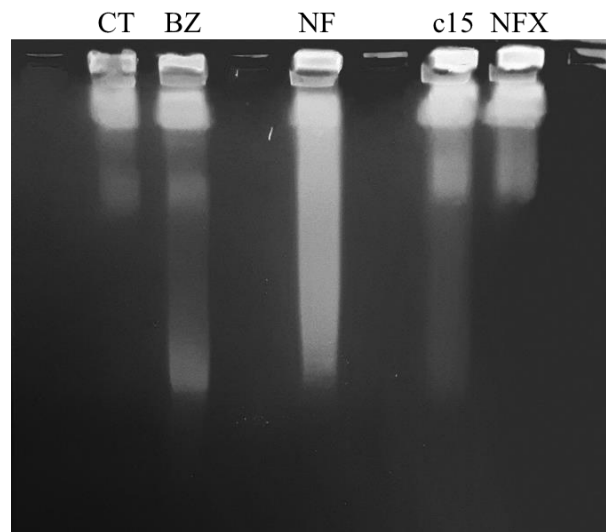


Figura 27 – Análise da integridade do DNA por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 foram incubadas na ausência de composto (CT) ou em presença de Benznidazol (BZ, 240 μM); Nifuroxazida (NF, 300 μM); o derivado c15 (24 μM) e Nifurtimox (NFX, 48 μM) por 48 h a 28 °C. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio

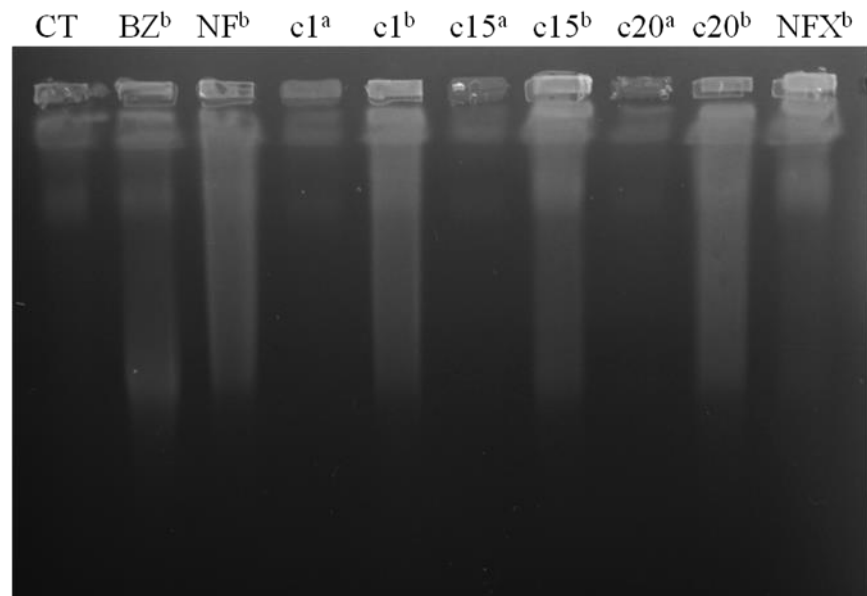


Figura 28 – Análise da integridade do DNA por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE). Epimastigotas da cepa Silvio X10 c11 foram incubados na ausência de composto (CT) ou em presença de Benznidazol (BZ, 240 μM); Nifuroxazida (NF, 300 μM); os derivados c1 (160 μM), c15 (24 μM) e c20 (24 μM); e Nifurtimox (NFX, 48 μM) por 24 h (a) ou 48 h (b) a 28 °C. O gel de agarose foi corado com brometo de etídio.

6. DISCUSSÃO

Nitrocompostos possuem diversas aplicações clínicas, dentre as quais cita-se seu uso como antianginosos, anti-hipertensivos, anticoagulantes, anti-histamínicos e anti-tumorais, bem como seu uso no tratamento de enfermidades causadas por bactérias e protozoários. Neste contexto, o grupo do Professor Leoberto Costa Tavares da FCF-USP, visando obter compostos ativos contra cepas de *S. aureus* resistentes a fármacos e contra *T. cruzi*, concentrou estudos no desenvolvimento de derivados do nitrocomposto nifuroxazida, antibiótico utilizado no tratamento de diarreias causadas por bactérias enteropatogênicas (*Shigella*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Klebsiella* e *Yersinia*) (HEALTHY SKEPTICISM, 1997). Dentre os derivados de NF sintetizados, alguns mostraram atividade contra formas epimastigotas da cepa Y de *T. cruzi*, com valores de CI_{50} semelhantes ao do NFX (PALACE-BERL et al., 2013).

Considerando que cepas de *T. cruzi* apresentam diversidade genotípica e fenotípica, incluindo sensibilidade diferencial aos fármacos usados no tratamento da DC, era importante verificar se os derivados de NF eram ativos contra cepas resistentes a BZ e NFX, das quais a cepa Colombiana é considerada uma cepa de referência. Isto determinou o estabelecimento de uma colaboração entre nosso laboratório no IQ-USP e o laboratório do Prof. Tavares. Nesta colaboração nosso projeto de mestrado esteve inserido.

Duas cepas, ambas da DTU TcI e ambas isoladas de humanos, foram escolhidas para nosso projeto: a cepa Silvio X10 c11 e a cepa Colombiana. Inicialmente, investigamos a influência da composição do meio LIT na atividade dos compostos. Duas formulações de meio LIT foram utilizadas: um meio suplementado com hemoglobina (LIT-Hb) e outro com hemina (LIT-He). Além disto, o meio LIT-Hb é mais pobre em nutrientes em relação ao meio LIT-He (Tabela 1). Ambos os meios foram suplementados com 10% de SFB. Observamos uma variação de cerca 20% nos valores do tempo de duplicação (*td*) das duas cepas nas duas formulações do meio LIT. Como esperado, maiores valores dos *tds* foram observados no meio mais pobre em nutrientes (LIT-Hb). Isto foi comprovado ao cultivarmos as cepas no meio Grace-10% SFB. Neste meio, os valores de *td* são, em média, duas vezes maiores que os *tds* obtidos no meio LIT-He (Tabela 2).

Investigamos também o efeito da composição do meio na atividade de dois derivados de NF, um que havia demonstrado atividade tripanocida contra epimastigotas da cepa Y (c15) e outro inativo (c14). Verificamos que nos três meios (LIT-He, LIT-Hb e Grace) a atividade diferencial dos compostos se mantinha. Para o composto com atividade tripanocida (c15), nos

meios LIT a CI_{50} não apresentava diferenças significativas. No entanto, no meio Grace a sensibilidade das cepas a c15 foi cerca de 30% maior (Tabela 3).

Os dados obtidos mostraram ainda que, para os derivados de NF analisados, a cepa Colombiana não apresentava menor sensibilidade (ou maior resistência) do que a cepa Silvio X10 c11, ao contrário do observado para BZ e NFX (FILARDI e BRENER, 1987). Quando um painel maior de compostos foi avaliado, para vários derivados de NF, a cepa Colombiana foi mais sensível que Silvio X10 c11 (PALACE-BERL et al., 2018, Tabela 1 do Material Suplementar), sugerindo que o fenômeno de resistência é específico para o composto em análise. Em função destas observações, e tendo em vista que Silvio X10 c11 é um clone, ao contrário da cepa Colombiana que corresponde a uma população de parasitos, os estudos subsequentes foram conduzidos predominantemente com a cepa Silvio X10 c11, cultivada em meio LIT-He, de mais fácil preparo.

Para avaliar a atividade de derivados de NF sobre *T. cruzi*, utilizamos a seguinte sistemática: (i) avaliação contra formas epimastigotas; (ii) avaliação do efeito citotóxico para células de mamífero em cultura; (iii) avaliação da atividade de compostos promissores sobre formas tripomastigotas livres.

Primeiramente, avaliamos o efeito de sete derivados de NF sobre formas epimastigotas, usando como controles BZ e NFX. Verificamos que todos os análogos apresentam atividade tripanocida maior que BZ e quatro deles (c13, c15, c19 e c20), maior que NFX. Observamos que os derivados apresentam baixa citotoxicidade para as células LLC-MK₂ que, porém, para alguns derivados, é maior que a de BZ e NFX (Tabela 6).

Com base na atividade promissora dos compostos, Fanny Palace-Berl (2016), utilizando a análise exploratória dos dados e modelos de QSAR (*quantitative structure activity relationships* - relação quantitativa entre a estrutura e atividade), desenhou e sintetizou novos compostos (N'-[(5-nitrofurano-2-il) metileno] hidrazida substituída). A atividade dos mesmos foi avaliada contra formas epimastigotas das cepas Silvio X10 c11 e da cepa Colombiana (PALACE-BERL, 2016; PALACE-BERL et al., 2018). Nós analisamos a atividade citotóxica de cinco novos compostos (BSF-33, BSF37-BSF-40, Tabela 7), e verificamos que apresentam baixa citotoxicidade para células de mamífero, com valores de CC_{50} acima de 100 μ M. Isto determinou, posteriormente, o ensaio dos compostos frente a formas amastigotas intracelulares, por metodologia fenotípica de análise de alto conteúdo (HCA'), realizado pelo grupo da Dra. Carolina Borsoi Moraes. Os resultados, descritos em Palace-Berl et al. (2018), indicam que os novos derivados de NF apresentam uma atividade

contra amastigotas cerca de 64 vezes superior ao BZ e seletividade de até 50 vezes superior a este fármaco.

Deve ser lembrado que formas amastigotas intracelulares são o estágio do *T. cruzi* que predomina na fase crônica da doença de Chagas. Por outro lado, na fase aguda, verifica-se uma parasitemia elevada de formas tripomastigotas. À vista disso, verificamos que os compostos BSF-38, BSF-39 e BSF-40, na concentração de 1 μM , promovem a mortalidade de 98,5% dos tripomastigotas da cepa Colombiana, após incubação por 20 h a 37 °C, ao passo que a mortalidade provocada por NFX é de apenas 7,3 % (Tabela 8). Os dados obtidos por nós estão publicados no artigo Palace-Berl et al. (2018) e indicam o potencial dos compostos no tratamento da fase aguda e crônica da doença de Chagas.

O mecanismo de ação da NF não está estabelecido, mas, por analogia com o que foi proposto para outros compostos nitroheterocíclicos, supõe-se que a redução do grupo nitro seja fundamental para o estabelecimento de sua atividade. Embora os radicais livres formados no processo de biorredução tenham vida curta, presume-se que esta seja suficientemente longa para atingir vários alvos biológicos tais como DNA, enzimas ou membranas biológicas (PAULA, SERRANO, TAVARES, 2009).

Desta forma, outro objetivo contemplado em nosso projeto foi o de determinar algumas características relacionadas ao modo de ação de cinco derivados de NF. Ressaltamos que os dados discutidos a seguir representam um levantamento preliminar destas características, e que cada uma delas deverá ser explorada com maior profundidade para se ter a definição do modo de ação dos compostos. Na maior parte dos estudos, utilizamos os compostos numa única concentração de 50 μM , que é cerca de 10 vezes o valor da CI_{50} dos mesmos. Por outro lado, lembramos que o valor da CI_{50} foi determinado após um período de incubação de 72 h, ao passo que nos ensaios o efeito foi monitorado após 2 h de incubação (em média). Embora, a variação da concentração dos derivados poderá fornecer informações adicionais sobre o modo de ação dos mesmos, a concentração máxima que poderá ser utilizada é de 100 μM .

Em nosso estudo, escolhemos cinco compostos da série original, isto é, antes da síntese da nova série de derivados da NF (denominação BSF). Para efeito de comparação, escolhemos compostos com baixa (c1) e com elevada atividade tripanocida (c5, c15, c19 e c20), aferida a partir dos valores de CI_{50} (Tabela 9). Ainda, levamos em consideração características de sua hidrofobicidade, baseada nos valores de P, parâmetro que indica a tendência preferencial do composto em dissolver-se em uma fase oleosa (lipossolubilidade) ou aquosa (hidrossolubilidade). O valor do logaritmo de P, CLogP , foi obtido com o

programa *Marvin Beans* (*Marvin Beans*, versão 5.4.0.1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapeste, Hungria) por Fanny Palace-Berl. Os compostos c1 e c5 apresentam valores de CLogP de -0,97 e 0,70, respectivamente, indicando serem mais hidrofílicos; os compostos c15, c19 e c20 apresentam valores de ClogP entre 2 e 3,70, indicando serem mais hidrofóbicos e, teoricamente, terem a capacidade de atravessar membranas biológicas (MASUNARI, TAVARES, 2006). Por outro lado, o caráter hidrofóbico desses compostos dificultou bastante a realização dos ensaios pretendidos.

A primeira característica investigada foi a capacidade de os derivados de NF serem ativados pela nitroredutase mitocondrial de tipo I de *T. cruzi* (*TcNTR*), de putativa origem bacteriana (WILKINSON et al., 2008). A *TcNTR* recombinante foi obtida e purificada, utilizando o plasmídeo pTrcHis-C-NTR, que contém a porção correspondente ao sítio catalítico da enzima. Tendo em vista a possível origem bacteriana desta enzima, padronizamos as condições para a determinação de sua atividade *in vitro* utilizando a NTR comercial de *E. coli*. Em função do grau de solubilidade dos derivados de NF no meio reacional aquoso, foi possível determinar a atividade da *TcNTR* apenas para os compostos c1, c5 e c15. Os dados indicam que, nas condições reacionais, a taxa de ativação de c5 é o dobro da taxa de ativação de c1 e c15 (Tabela 11).

A eficiência do ensaio foi comprovada pela capacidade da *TcNTR* recombinante em ativar BZ, NFX e NF. Observamos que a atividade específica (*a.e.*) da *TcNTR* por nós purificada é menor do que a da *TcNTR* reportada por Wilkinson e colaboradores (2008). Como exemplo, para BZ, aqueles autores relatam uma *a.e.* de 557 nmoles de NADH oxidado/min/mg, ao passo que nós obtivemos um valor de 234 nmoles de NADH oxidado/min/mg. As diferenças podem estar relacionadas com o grau de pureza das duas preparações enzimáticas. Outro dado discrepante é a *a.e.* da *TcNTR* reportada por Wilkinson et al. (2008) para NFX (509 nmoles de NADH oxidado/min/mg), ao passo que em nossos ensaios a *TcNTR* apresentou *a.e.* de 72,96 nmoles de NADH oxidado/min/mg. Não temos explicação para este fato.

O conjunto dos dados nos leva a concluir que a *TcNTR* possui a capacidade de ativar os derivados de NF. O fato de não ter sido possível determinar *in vitro* a atividade da enzima recombinante sobre os compostos c19 e c20, não exclui a possibilidade de sua ativação *in vivo*, condição na qual a solubilidade dos mesmos deve ser influenciada por outros fatores.

Pela complexidade dos ensaios e a baixa estabilidade da *TcNTR* recombinante, foi possível determinar o valor do K_m aparente apenas para c5, c15 e NFX. Os dados sugerem maior afinidade da *TcNTR* para c5 (K_m ap 7,95 μ M) do que para c15 (K_m ap 30,25 μ M) e NFX

(K_m ap 92,30 μ M) (Tabela 12). Isto seria condizente com os valores de *a.e.* da enzima para os mesmos compostos (Tabela 11). De acordo com os valores de ClogP (Tabela 9), o composto c5 é mais hidrofílico que c15, o que poderia explicar a maior afinidade e maior velocidade de reação da TcNTR *in vitro* para este derivado.

Outro parâmetro aqui analisado refere-se à captação dos derivados de NF por formas epimastigotas de Silvio X10 c11. Por não termos disponíveis compostos radiativos, o acúmulo intracelular dos mesmos foi monitorado a partir da redução de sua concentração no meio de cultura, após centrifugação dos parasitos. Este procedimento não leva em consideração que uma parte do composto que “desaparece” no meio poderia estar aderida à membrana do parasito.

Em função da baixa solubilidade de c15, c19 e c20, adotamos o meio de incubação proposto por Boiani et al. (2010) (um meio isotônico, pH 7,2 que contém 10 mM glicose), acrescido de 10 mg/mL de BSA e 1% DMSO. BSA foi adicionada visando reproduzir a presença de proteínas no meio LIT-10% SFB. No meio de incubação utilizado, o coeficiente da absorvidade molar dos derivados de NF foi semelhante (Tabela 14). Para calcular a quantidade de composto interiorizada pelos epimastigotas, a partir da redução da absorbância do meio, foi necessário determinar a cinética da variação da absorbância do meio em ausência de parasitos. Para BZ e NFX, partindo-se de uma concentração inicial de 50 μ M, verificamos que após 120 min de incubação a 28 °C houve redução de cerca de 1 nmol de cada composto no meio. Para os derivados de NF, na mesma condição experimental, a redução da quantidade de composto no meio varia de 1 nmol (c1) a 8 nmoles (c20) (Tabela 16). Para alguns compostos, por exemplo c20, a redução do composto no meio aumenta com o tempo de incubação a 28 °C. Para outros compostos, como c19, sua redução no meio é maior a 4 °C. Embora não tenhamos elementos para concluir se isto se deve à degradação do composto ou à sua precipitação no meio de incubação, apoiamos a segunda hipótese.

A cinética de captação dos derivados de NF foi determinada e, após descontar dos valores obtidos o desaparecimento do composto no meio, em ausência de parasitos, obtivemos a quantidade de composto interiorizada por 10^8 epimastigotas. A cinética de captação a 28 °C varia com a natureza do composto (Figura 22). Para os compostos c5 e c20 obtivemos uma cinética claramente bifásica, com velocidade inicial rápida, seguida por uma velocidade de interiorização mais lenta. Cinéticas bifásicas foram reportadas para a interiorização de NFX em cepas de *T. cruzi* (TSUHAKO et al., 1991). Os autores sugerem que a fase rápida refletiria o equilíbrio do fármaco entre a fase aquosa e a membrana dos parasitos e que a fase mais lenta corresponderia a um processo combinado da interiorização de NFX e seu metabolismo.

Se considerarmos a quantidade total de composto interiorizado após 2 h de incubação a 28 °C verificamos que os compostos c5, c15 e c20 apresentam as maiores taxas de captação (~17 nmoles em média) (Tabela 17). Nas mesmas condições experimentais, a captação de NFX é de 14,5 nmoles, valor que é semelhante a valores anteriormente relatados. Para 10⁸ epimastigotas das cepas YuYu, Y e Basileu foi reportada a captação de 17; 18 e 32 nmoles de NFX (TSUHAKO et al., 1981) e para a cepa Tulahuen 2, 27 nmoles de NFX (BOIANI et al., 2010). No futuro, ensaios de captação dos compostos deverão ser conduzidos variando-se a concentração dos mesmos no meio de incubação.

Para efeito comparativo, compilamos abaixo uma tabela que resume os valores de ClogP, de CI₅₀ e da quantidade de composto interiorizado após 2 h de incubação a 28 °C dos cinco derivados de NF (Tabela 22).

Tabela 22 – Algumas características dos derivados de NF estudados			
Composto	ClogP^a	CI₅₀ (μM)^b	Captação (nmoles)^c
c1	-0,97	23,55 ± 0,63	10,39 ± 2,78
c5	0,70	8,71 ± 1,98	16,92 ± 0,37
c15	2,55	2,78 ± 0,57	17,72 ± 2,10
c19	2,01	4,20 ± 0,05	5,05 ± 0,78
c20	3,70	2,84 ± 0,17	19,07 ± 1,95

^aValores de ClogP calculados a partir do coeficiente de partição n-octanol/água.

^bValores de CI₅₀ em relação a epimastigotas da cepa Silvio X10 c11.

^cCaptação de composto por 10⁸ formas epimastigotas a 28 °C (Média e desvio padrão de três réplicas).

Para os compostos c15 e c20, que apresentam o maior caráter hidrofóbico, nota-se uma boa correlação entre a quantidade de composto captada e o valor da CI₅₀. Isto não se verifica para o composto c5 que, apesar de ter elevado nível de captação, apresenta atividade tripanocida menor que c15 e c20. Isto sugere que, uma vez interiorizados, a metabolização dos compostos gere produtos com atividade diferencial.

A taxa de captação de c1 é cerca de 40% mais baixa que c15 e c20. Isto seria condizente com seu elevado caráter hidrofílico e sua baixa atividade parasiticida. Verificamos que o composto c19, apesar de ter um valor de ClogP condizente com a capacidade de atravessar membranas biológicas, apresenta a menor taxa de internalização nos epimastigotas, sugerindo que outras características da molécula, além do valor de ClogP, calculado *in silico*, influam na captação do composto. Para efeito comparativo e de discussão, na Figura 29 apresentamos a estrutura molecular de c15 e de c19, e as respectivas taxas de captação. No composto c15, a cadeia alquílica possibilita variação nas conformações da molécula, algumas das quais poderiam ser melhor acomodadas num putativo receptor/transportador da

membrana. Por outro lado, no composto c19, a cadeia alcofílica é restritiva na liberdade conformacional da molécula, com conseqüente variação de afinidade pelo mesmo receptor.

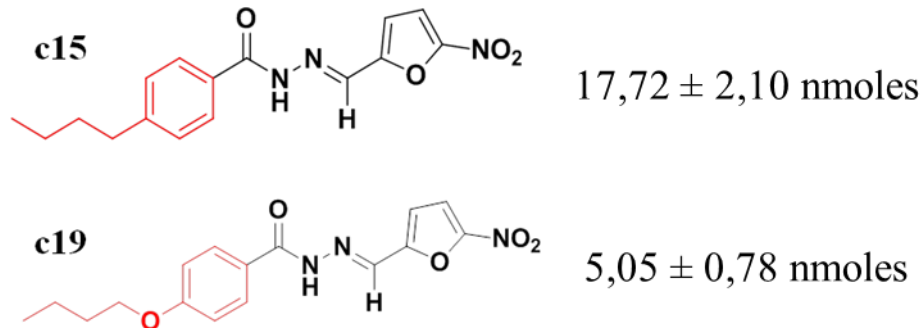


Figura 29 - Estrutura molecular de c15 e c19 e valores da captação por 10^8 formas epimastigotas a 28 °C.

Para obter alguma informação sobre o processo de interiorização dos derivados de NF em formas epimastigotas, os ensaios de captação foram conduzidos também a 4 °C (Figura 20). Considerando os valores de captação após 120 min de incubação, verificamos que a captação a 28 °C de c1, c5, c20 e de NFX é, em média, 3,5 vezes maior que a 4 °C. Estas diferenças podem estar relacionadas com a fluidez da membrana plasmática, que seria maior na temperatura mais elevada. Curiosamente, para o composto c15 a razão de captação 28 °C/4 °C é 9. Não temos explicação para esta observação, e o ensaio deverá ser repetido.

A passagem de um fármaco, através da membrana plasmática, para o interior da célula pode ocorrer por diferentes processos: por difusão passiva, direcionada por um gradiente de concentração; por difusão facilitada, quando a molécula se combina com proteínas transportadoras ligadas à membrana; por transporte ativo, que envolve proteínas transportadoras específicas e que depende de energia (ATP); ou por pinocitose/endocitose, via invaginação da membrana que engloba a molécula, geralmente de grande tamanho, e a traz para o interior da célula (PECK, HILL, WILLIAMS, 2008).

Em formas epimastigotas de *T. cruzi* foi evidenciado que moléculas de albumina são interiorizadas por endocitose via membrana da bolsa flagelar e que este processo ocorre com uma eficiência 200 vezes maior a 28 °C do que a 4 °C (BATISTA et al., 2015). Embora nos ensaios de interiorização nós tenhamos utilizado BSA para aumentar a solubilização dos derivados de NF, o grau de inibição do processo promovido pela incubação a 4 °C afasta a possibilidade de os compostos serem interiorizados por endocitose.

Para verificar se a captação do composto ocorre por transporte ativo, utilizamos dois inibidores da síntese de ATP: 2-deoxiglicose e azida sódica. Nos ensaios de consumo de

oxigênio (Figura 26) comprovamos a eficiência da inibição da síntese de ATP nas concentrações utilizadas. Comprovamos ainda que, nas concentrações utilizadas e após 2 h de incubação, os inibidores promovem cerca de 30% da morte dos parasitos e que os parasitos vivos apresentam redução de motilidade. A observação de que a captação dos compostos é, em média, 2 vezes menor na presença dos inibidores da síntese de ATP do que em sua ausência, afasta a possibilidade de que eles sejam interiorizados via transporte ativo.

Desta forma, os resultados obtidos até o momento são sugestivos de que a entrada dos derivados de NF no parasito ocorra por difusão passiva ou por difusão facilitada mediada por receptor/transportador (não dependente de ATP). Penetração passiva foi proposta por Barrett et al. (2000) para a captação do fármaco nitroimidazólico Megazol em tripanossomas Africanos. A verificação de que compostos mais lipofílicos apresentam atividade parasiticida mais elevada seria sugestiva da presença de uma bolsa lipofílica em um putativo receptor dos compostos, que acomodaria melhor derivados com maior hidrofobicidade (PALACE-BERL et al., 2018). Neste estudo, verificamos que, além da hidrofobicidade, características conformacionais do composto influem na taxa de captação.

Embora BX e NFX estejam em uso há cerca de 50 anos, seu modo de ação ainda não está totalmente elucidado. Está claro que os compostos necessitam ser ativados por nitroredutases, que reduzem o grupo nitro (NO_2) ao grupo amino (NH_2) (Figura 30). No caso de BZ, metabólitos reduzidos se ligariam covalentemente ao DNA, proteínas, lipídeos e tióis do parasito, promovendo a inibição da síntese de componentes necessários e aumentando a degradação de macromoléculas (DIAZ DE TORANZO et al., 1988; MAYA et al., 2007; DIAS et al., 2009) (Figura 30). Por outro lado, estudos em modelos experimentais indicam que BZ, em doses terapêuticas, é capaz de promover estresse oxidativo em hepatócitos (PEDROSA et al., 2001). Um único trabalho apresenta evidências de que BZ se ligaria covalentemente ao DNA, proteínas e lipídeos (DIAZ DE TORANZO et al., 1988). No estudo, os autores incubaram os parasitos com BZ marcado com C^{14} . Após extração das macromoléculas, foi detectada radiatividade a elas associada. Que seja de nosso conhecimento, não foram feitos estudos posteriores para verificar qual metabólito de BZ estaria ligado, ou em qual constituinte das macromoléculas ocorreria a ligação.

A adição de NFX e de NADH a homogenatos de formas epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi* promoveu o aparecimento de um nitro ânion radical, assim como do ânion superóxido e de H_2O_2 (DOCAMPO et al., 1981). Isto levou a postular que a ativação de NFX ocorreria por nitroredutases (de tipo II, Patterson e Wyllie, 2014) e que o nitro ânion radical reduziria o oxigênio molecular (O_2), formando o íon superóxido (O_2^-) e regenerando o

grupo NO_2 do composto, num processo conhecido como ciclo redox (*redox cycling*) (Figura 30). O íon superóxido, pela ação da superóxido dismutase, geraria peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que, pela reação de Haber-Weiss, na presença de íons Fe^{III} , formaria o radical hidroxila. A esta espécie tem sido atribuído o efeito tripanocida por mecanismos complexos que envolveriam ligação a lipídeos, proteínas e ao DNA (MAYA et al., 2007; DIAS et al., 2009). Deve ser ressaltado que, em *T. cruzi*, a comprovação experimental destes mecanismos não foi apresentada.

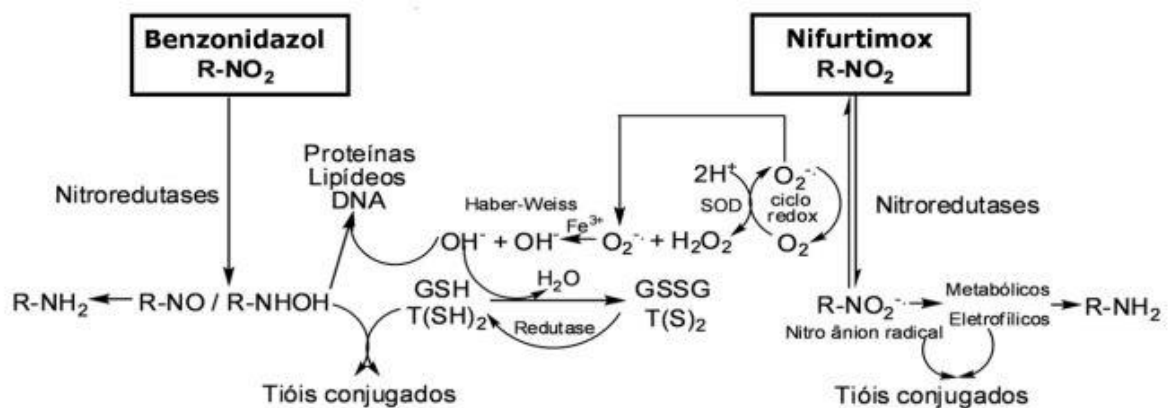


Figura 30 - Modos de ação propostos para Benznidazol e Nifurtimox. Extraído de DIAS et al. (2009).

Na vigência do ciclo redox, promovido por nitrocompostos, deveria observar-se o aumento do consumo de oxigênio e o aumento da produção de H_2O_2 pelos parasitos. Em nosso estudo, observamos que os derivados de NF promovem inibição do consumo de oxigênio que alcança o valor máximo de 50%, no caso dos compostos c15 e c20, utilizados na concentração de $50 \mu\text{M}$. Nas mesmas condições, NFX inibe apenas 13%. Desta forma, os dados sugerem fortemente que os derivados de NF não atuam via ciclo redox.

A confirmação desta conclusão foi obtida ao verificarmos que a adição de $50 \mu\text{M}$ dos compostos ou de NFX não induz a produção de H_2O_2 pelos epimastigotas. Por sua vez, a Menadiona (2-Metilnaftaleno-1,4-diona, ou Vitamina K) que, sabidamente atua via ciclo redox (BOIANI, et al., 2010), promove a formação de $56 \pm 5,56 \text{ nmoles/L}$ de H_2O_2 na concentração de $5 \mu\text{M}$. Nossos resultados com NFX e Menadiona apoiam integralmente as observações de Boiani et al. (2010), indicando que NFX não atua via ciclo redox, como postulado anteriormente (MAYA et al., 2007; DIAS et al., 2009).

Menadiona e heterociclos contendo N-óxido, na concentração de $25 \mu\text{M}$, promovem a inibição de até 70% da atividade desidrogenásica total de *T. cruzi* (BOIANI et al., 2010). Por

sua vez, a inibição máxima desta atividade por alguns derivados de NF, na concentração de 50 μM , é de 20%, sugerindo que sua ação ocorra por processos diferentes daqueles dos compostos acima.

As mitocôndrias são organelas necessárias para a síntese de ATP, principal fonte de energia celular. Neste processo é fundamental a manutenção do potencial de membrana mitocondrial, gerado pelo funcionamento da cadeia respiratória. A destruição deste potencial determina a inibição da síntese de ATP, levando à morte celular.

A atividade de naftofuranquinonas foi investigada pelo grupo da Dra. Solange L. de Castro do Instituto Oswaldo Cruz (MENNA-BARRETO et al., 2009). Os autores verificaram que estes compostos promovem drásticas alterações estruturais da mitocôndria de epimastigotas de *T. cruzi*. Como consequência, ocorre o colapso do potencial da membrana mitocondrial e a inibição do consumo de oxigênio. Os autores concluem que a ação tripanocida das naftofuranquinonas está associada à disfunção mitocondrial.

Fanny Palace-Berl em sua tese de doutorado investigou o efeito de derivados de NF sobre o potencial de membrana mitocondrial, verificando que estes não promovem a despolarização da membrana (PALACE-BERL, 2016). Tomados no seu conjunto, os dados disponíveis sugerem que o efeito tripanocida dos derivados de NF não esteja associado a alterações estruturais da mitocôndria dos epimastigotas. Isto poderá ser confirmado em estudos envolvendo microscopia eletrônica.

Espécies reativas de oxigênio e metabólitos eletrofílicos podem reagir com ácidos nucleicos, promovendo lesões no DNA. Como comentado acima, na ativação de BZ haveria a formação de metabólitos eletrofílicos. Rajão et al. (2014) verificaram que a incubação de epimastigotas com este fármaco aumentava a produção de desoxiguanosina trifosfato oxidada (8-oxodGTP). Os autores comentam que a incorporação de 8-oxodGTP no DNA, promoveria um pareamento espúrio com adenina, cujo reparo promoveria quebras nas fitas do DNA. A análise por microscopia eletrônica de transmissão confirmou alterações na ultraestrutura do DNA nuclear e mitocondrial do parasito (RAJÃO et al., 2014). A confirmação de que BZ induz quebras no DNA foi obtida utilizando-se eletroforese de campo pulsado (PFGE). O padrão de migração no gel do DNA de parasitos tratados com 240 μM BZ evidenciou um rastro que aumenta com o período de incubação (RAJÃO et al., 2014).

Nós empregamos o procedimento descrito por esses autores para verificar se os derivados de NF promoveriam quebras no DNA. Após PFGE observamos que a incubação com c1 (160 μM), c15 (24 μM) e c20 (24 μM) resulta na fragmentação do DNA, que aumenta com o período de tratamento. O padrão de migração do DNA obtido para os derivados, após

48 h de incubação, é semelhante àquele obtido para BZ e NF, mas em concentrações muito superiores, 240 μM e 300 μM , respectivamente. Os dados sugerem que a incubação com NFX 48 μM não produza, ou produza um número bem inferior de lesões no DNA. No futuro será interessante verificar se os derivados de NF também determinam o aumento da concentração de 8-oxodGTP.

Em resumo, o estudo de algumas características relacionadas ao modo de ação de cinco derivados de NF, permite concluir: (i) que os compostos são ativados *in vitro* pela TcNTR, uma nitroredutase de tipo I de *T. cruzi*, de origem mitocondrial; (ii) que são interiorizados no parasito por um processo de difusão passiva ou por difusão facilitada mediada por receptor (não dependente de ATP); (iii) que promovem baixa inibição da atividade desidrogenásica total de epimastigotas; (iv) que a inibição máxima do consumo de oxigênio é da ordem de 50% para alguns derivados; (v) que os compostos não estimulam a liberação de H_2O_2 pelos epimastigotas.

As observações (iv) e (v) sugerem fortemente que os derivados de NF não atuam via ciclo redox.

O estudo mostra claramente que os derivados de NF induzem quebras no DNA, comparáveis àquelas produzidas por BZ, mas não por NFX.

Estudos adicionais serão necessários para a definição integral do modo de ação dos derivados de NF.

REFERÊNCIAS¹

- ALARCÓN DE NOYA, B. et al. **Large urban outbreak of orally acquired acute Chagas disease at a school in Caracas, Venezuela.** *The Journal of infectious diseases*, v. 201, n. 9, p. 1308-1315, 2010.
- ALVES, J. M. P. et al. **Identification and phylogenetic analysis of heme synthesis genes in trypanosomatids and their bacterial endosymbionts.** *PLoS one*, v. 6, n. 8, p. e23518, 2011.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. **The *Trypanosoma cruzi*–host-cell interplay: location, invasion, retention.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 10, p. 819-823, 2005.
- ANDREWS, K. T.; FISHER, G.; SKINNER-ADAMS, T. S. **Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases.** *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, n. 2, p. 95-111, 2014.
- BAHIA, M. T. et al. **Fexinidazole: a potential new drug candidate for Chagas disease.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 6, n. 11, p. 1870, 2012.
- BARR, S. C. et al. **A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 49, n. 12, p. 5160-5161, 2005.
- BARRETT, M. P. et al. **Uptake of the nitroimidazole drug megalozol by African trypanosomes.** *Biochemical pharmacology*, v. 59, n. 6, p. 615-620, 2000.
- BATISTA, C. M. et al. ***Trypanosoma cruzi* Intracellular Amastigotes Isolated by Nitrogen Decompression Are Capable of Endocytosis and Cargo Storage in Reservosomes.** *PLoS one*, v. 10, n. 6, p. e0130165, 2015.
- BELLERA, C. L. et al. **High-throughput drug repositioning for the discovery of new treatments for Chagas disease.** *Mini reviews in medicinal chemistry*, v. 15, n. 3, p. 182-193, 2015.
- BENAIM, G. et al. **Amiodarone Has Intrinsic Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity and Acts Synergistically with Posaconazole.** *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 49, n. 3, p. 892-899, 2006.
- BERRIDGE, M. V.; TAN, A. S. **Characterization of the cellular reduction of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction.** *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 303, n. 2, p. 474-482, 1993.
- BOIANI, M. et al. **Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?.** *Biochemical pharmacology*, v. 79, n. 12, p. 1736-1745, 2010.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023.** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002. 24 p.

BRENER, Z. **Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 79, p. 149-155, 1984.

BRUN, R. et al. **In vitro trypanocidal activities of new S-adenosylmethionine decarboxylase inhibitors.** Antimicrobial agents and chemotherapy, v. 40, n. 6, p. 1442-1447, 1996.

CANO, M. I. et al. **Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project.** Molecular and biochemical parasitology, v. 71, n. 2, p. 273-278, 1995.

CARRANZA, J. C. et al. **Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes.** Journal of bioenergetics and biomembranes, v. 41, n. 3, p. 299-308, 2009.

CHATELAIN, E. **Chagas Disease Drug Discovery Toward a New Era.** Journal of Biomolecular Screening, v. 20, n. 1, p. 22 – 35, 2015.

CHATELAIN, E. **Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel?** Computational and structural biotechnology journal, v. 15, p. 98-103, 2017.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U. **Active penetration of *Trypanosoma cruzi* into host cells: historical considerations and current concepts.** Frontiers in immunology, v. 4, 2013.

DIAS, L. C. et al. **Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos.** Química Nova, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.

DIAS, J. C.; AMATO NETO, V. **Prevention Concerning the Different Alternative Routes for Transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 44, p. 68–72, 2011

DIAZ DE TORANZO, E. G. et al. **Interaction of Benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*.** Experientia, v. 44, n. 10, p. 880-881, 1988.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*), 2013. **Drug Trial for Leading Parasitic Killer of the Americas Shows Mixed Results but Provides New Evidence for Improved Therapy.** Disponível em: <<http://www.dndi.org/media-centre/press-releases/354-media-centre/press-releases/1702-e1224-po.html>>. Acesso em: 10 ago. 2015.

DOCAMPO, R. et al. **Mechanism of Nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*.** Biochemical pharmacology, v. 30, n. 14, p. 1947-1951, 1981.

DUSCHAK, V. G.; COUTO, A. S. **Cruzipain, the major cysteine protease of *Trypanosoma cruzi*: a sulfated glycoprotein antigen as relevant candidate for vaccine development and drug target. A review.** Current Medicinal Chemistry, v. 16, n. 24, p. 3174-3202, 2009.

FIELD, M. C. et al. **Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need.** Nature Reviews Microbiology, 2017.

- FILARDI, L. S.; BRENER, Z. **Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 81, n. 5, p. 755-759, 1987.
- FREYMANN, D. M. et al. **Efficient identification of inhibitors targeting the closed active site conformation of the HPRT from *Trypanosoma cruzi*.** Chemistry & Biology, v. 7, n. 12, p. 957-968, 2000.
- GARZONI, L. R. et al. **Antiparasitic activity of risedronate in a murine model of acute Chagas' disease.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 23, n. 3, p. 286-290, 2004.
- GILBERT, I. H.; LEROY, D.; FREARSON, J. A. **Finding new hits in neglected disease projects: target or phenotypic based screening?** Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 11, n. 10, p. 1284-1291, 2011.
- GIULIVI, C.; TURRENS, J. F.; BOVERIS, A. **Chemiluminescence enhancement by trypanocidal drugs and by inhibitors of antioxidant enzymes in *Trypanosoma cruzi*.** Molecular and biochemical parasitology, v. 30, n. 3, p. 243-251, 1988.
- GULL, K. **The cytoskeleton of trypanosomatid parasites.** Annual Reviews in Microbiology, v. 53, n. 1, p. 629-655, 1999.
- HALL, B. S.; BOT, C.; WILKINSON, S. R. **Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites.** Journal of Biological Chemistry, v. 286, n. 15, p. 13088-13095, 2011.
- HEALTHY SKEPTICISM. **SmithKline Beecham Ambatrol (nifuroxazide)**, jun. 1997. Disponível em: <http://www.healthyskepticism.org/global/malam/int/mi1997-05_06/>. Acesso em: 06 mar. 2018.
- HULL, R. N.; CHERRY, W. R.; TRITCH, O. J. **Growth characteristics of monkey kidney cell strains LLC-MK₁, LLC-MK₂, and LLC-MK₂ (NCTC-3196) and their utility in virus research.** Journal of Experimental Medicine, v. 115, n. 5, p. 903-918, 1962.
- JEGANATHAN, S. et al. **The distribution of Nifurtimox across the healthy and trypanosome-infected murine blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers.** Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 336, n. 2, p. 506-515, 2011.
- JORGE, S. D. et al. **Novel Benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: Design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay.** Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 19, n. 16, p. 5031-5038, 2011.
- KHURANA, V. et al. **Toward stem cell-based phenotypic screens for neurodegenerative diseases.** Nature Reviews Neurology, v. 11, n. 6, p. 339-350, 2015.
- KLUG, D. M.; GELB, M. H.; POLLASTRI, M. P. **Repurposing strategies for tropical disease drug discovery.** Bioorganic & medicinal chemistry letters, v. 26, n. 11, p. 2569-2576, 2016.

KOŘENÝ, L.; LUKEŠ, J.; OBORNÍK, M. **Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all?**. International journal for parasitology, v. 40, n. 2, p. 149-156, 2010.

LEPESHEVA, G. I. et al. **VFV as a new effective CYP51 structure-derived drug candidate for Chagas disease and visceral leishmaniasis**. The Journal of Infectious Diseases, v. 212, n. 9, p. 1439-1448, 2015.

LIMA, L. et al. **Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit)**. Acta tropica, v. 151, p. 166-177, 2015.

MAHATA, S. et al. **Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells**. BMC complementary and alternative medicine, v. 12, n. 1, p. 15, 2012.

MASUNARI, A.; TAVARES, L. C. **2D QSAR studies of 5-nitro-2-thiophylidene derivatives with antimicrobial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)**. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 42, n. 2, p. 203-214, 2006.

MAYA, J. D. et al. ***Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofuran derivatives**. Biochemical pharmacology, v. 65, n. 6, p. 999-1006, 2003.

MAYA, J. D. et al. **Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host**. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 146, n. 4, p. 601-620, 2007.

MCKERROW, J. H. et al. **Two approaches to discovering and developing new drugs for Chagas disease**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 263-269, 2009.

MELOS, J. L. R.; ECHEVARRIA, A. **Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potenciais alvos quimioterápicos**. Revista Virtual de Química, v. 4, n. 4, p. 374-392, 2012.

MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. **The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction**. Free Radical Biology and Medicine, v. 47, n. 5, p. 644-653, 2009.

MOLINA, I. et al. **Randomized trial of Posaconazole and Benznidazole for chronic Chagas' disease**. New England Journal of Medicine, v. 370, n. 20, p. 1899-1908, 2014.

MORTIMER, P. G. S.; PIDDOCK, L. J. V. **A comparison of methods used for measuring the accumulation of quinolones by Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus***. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 28, n. 5, p. 639-653, 1991.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. Journal of immunological methods, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

NOVY, F. G.; MCNEAL, W. J. **On the cultivation of *Trypanosoma brucei***. The Journal of Infectious Diseases, v. 1, n. 1, p. 1-30, 1904.

PALACE-BERL, F. et al. **5-nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis**. Bioorganic & Medicinal Chemistry, v. 21, p. 5395-5406, 2013.

PALACE-BERL, F. et al. **Designing and exploring active N'-[(5-nitrofuran-2-yl)methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients**. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 96, p. 330-339, 2015.

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**. 2016. Tese (Doutorado em Tecnologia Químico-Farmacêutica) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, University of São Paulo, São Paulo, 2016. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9135/tde-21122016-115223/>>. Acesso em: 27 fev. 2017.

PALACE-BERL, F. et al. **Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofuran-2-yl)methylene] substituted hydrazides against *Trypanosoma cruzi* to design novel active compounds**. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 144, p. 29-40, 2018.

PATTERSON, S.; WYLLIE, S. **Nitro drugs for the treatment of trypanosomatid diseases: past, present, and future prospects**. Trends in Parasitology, v. 30, n. 6, p. 289-298, 2014.

PAULA, F. R.; SERANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. **Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos**. Química Nova, v. 32, n. 4, p. 1013-1020, 2009.

PECK, T. E.; WILLIAMS, M.; HILL, S. A. Drug passage across the cell membrane. In: _____. **Pharmacology for anaesthesia and intensive care**. Cambridge University Press, 2008, cap. 1, p. 1-7.

PEDRIQUE, B. et al. **The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–11): a systematic assessment**. The Lancet Global Health, v. 1, n. 6, p. e371-e379, 2013.

PEDROSA, R. C. et al. **Time-dependent oxidative stress caused by Benznidazole**. Redox Report, v. 6, n. 4, p. 265-270, 2001.

PEÑA, I. et al. **New compound sets identified from high throughput phenotypic screening against three kinetoplastid parasites: an open resource**. Scientific reports, v. 5, p. 8771, 2015.

PEREIRA, K. S. et al. **Chagas' Disease as a Foodborne Illness**. Journal of Food Protection, v. 72, p. 441–446, 2009.

PhRMA. Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. **Pharmaceutical Industry Profile 2010**. Washington, DC: PhRMA; Março, 2010. Disponível em: <http://www.phrma-jp.org/wordpress/wp-content/uploads/old/library/industryprofile/Profile_2010_FINAL.pdf>. Acesso em: 21 dez. 2017.

PhRMA, Pharmaceutical Research and Manufacturers of America. **2016 Biopharmaceutical Research Industry Profile**. Washington, DC: PhRMA; Abril, 2016. Disponível em: <<http://phrma-docs.phrma.org/sites/default/files/pdf/biopharmaceutical-industry-profile.pdf>>. Acesso em: 01 mai. 2017.

PIDDOCK, L. J. V. et al. **Quinolone accumulation by *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli***. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 43, n. 1, p. 61-70, 1999.

PINK, R. et al. **Opportunities and challenges in antiparasitic drug discovery**. Nature Reviews Drug Discovery, v. 4, n. 9, p. 727-740, 2005.

PITA, S. S. da R.; PASCUTTI, P. G. **Alvos terapêuticos na doença de Chagas: a tripanotona redutase como foco**. Revista Virtual de Química, p. 307-24, 2011.

PRICE, P. J.; GREGORY, E. A. **Relationship between *in vitro* growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement**. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, v. 18, n. 6, p. 576-584, 1982.

RAJÃO, M. A. et al. **Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi***. Environmental and molecular mutagenesis, v. 55, n. 4, p. 309-321, 2014.

RASSI, A.; DE REZENDE, J. M. **American trypanosomiasis (Chagas disease)**. Infectious Disease Clinics, v. 26, n. 2, p. 275-291, 2012.

REGIS-DA-SILVA, C. G. et al. **Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation**. Molecular and biochemical parasitology, v. 149, n. 2, p. 191-200, 2006.

SANCHEZ, L. V.; RAMIREZ, J. D. **Congenital and Oral Transmission of American Trypanosomiasis: An Overview of Physiopathogenic Aspects**. Parasitology, v. 140, p. 147-159, 2013.

SBARAGLINI, M. L. et al. **Neglected tropical protozoan diseases: drug repositioning as a rational option**. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 16, n. 19, p. 2201-2222, 2016.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. **Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton**. Infection and Immunity, v. 59, n. 2, p. 645-654, 1991.

SHAPIRO, T. A.; SHOWALTER, A. F. ***In vivo* inhibition of trypanosome mitochondrial topoisomerase II: effects on kinetoplast DNA maxicircles**. Molecular and Cellular Biology, v. 14, n. 9, p. 5891-5897, 1994.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M.. **Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos.** Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v. 40, n. 2, p. 139-149, 2004.

TIBAYRENC, M. **Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach.** International Journal for Parasitology, v. 28, n. 1, p. 85-104, 1998.

TOBEY, E. N. **Trypanosomata and trypanosomiasis:(A Summary.)** The Journal of medical research, v. 15, n. 1, p. 117, 1906.

TORREELE, E. et al. **Fexinidazole -a new oral nitroimidazole drug candidate entering clinical development for the treatment of sleeping sickness.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 4, n. 12, p 923, 2010.

TSUHAKO, M. H. et al. **Comparative studies of Nifurtimox uptake and metabolism by drug-resistant and susceptible strains of *Trypanosoma cruzi*.** Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, v. 99, n. 3, p. 317-321, 1991.

TURRENS, J. F. **Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa.** Molecular Aspects of Medicine, v. 25, n. 1, p. 211-220, 2004.

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

VEIGA-SANTOS, P. et al. **SQ109, a new drug lead for Chagas disease.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 59, n. 4, p. 1950-1961, 2015.

VERLINDE, C. L. M. J. et al. **Glycolysis as a target for the design of new anti-trypanosome drugs.** Drug Resistance Updates, v. 4, n. 1, p. 50-65, 2001.

VILLALTA, F. et al. **VNI cures acute and chronic experimental Chagas disease.** The Journal of infectious diseases, v. 208, n. 3, p. 504-511, 2013.

WILKINSON, S. R. et al. **A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes.** Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

WILKINSON, S. R. et al. **Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives.** Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 11, n. 16, p. 2072-2084, 2011.

WILLIAMS, K. J.; PIDDOCK, L. J. **Accumulation of rifampicin by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*.** The Journal of antimicrobial chemotherapy, v. 42, n. 5, p. 597-603, 1998.

WYATT, P. et al. **Target validation: linking target and chemical properties to desired product profile.** Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 11, n. 10, p. 1275-1283, 2011.

ZENNO, S. et al. **Biochemical characterization of NfsA, the Escherichia coli major nitroreductase exhibiting a high amino acid sequence homology to Frp, a *Vibrio harveyi* flavin oxidoreductase.** Journal of bacteriology, v. 178, n. 15, p. 4508-4514, 1996.

ZHOU, Y. et al. **Thinking outside the “bug”: a unique assay to measure intracellular drug penetration in gram-negative bacteria.** Analytical chemistry, v. 87, n. 7, p. 3579-3584, 2015.

ZINGALES, B et al. **Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener- the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 92, n. 6, p. 811-814, 1997.

ZINGALES, B. et al. **A New Consensus for *Trypanosoma cruzi* Intraspecific Nomenclature: Second Revision Meeting Recommends TcI to TcVI.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 104, p. 1051–1054, 2009.

ZINGALES, B. et al. **The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications.** Infection, Genetics and Evolution, v. 12, n. 2, p. 240-253, 2012.

ZINGALES, B. ***Trypanosoma cruzi* genetic diversity: Something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity.** Acta tropica, 2017.

ANEXO A – Artigo publicado

European Journal of Medicinal Chemistry

Investigating the structure-activity relationships of N'-[(5-nitrofuranyl) 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.

* 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).

Contents lists available at ScienceDirect. European Journal of Medicinal Chemistry

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

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.011>

0223-5234/© 2017 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

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-nitrofuranyl) 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 (SI₀) greater than 200, in contrast to the SI₀ values of reference drugs (NFX, 16.45; BZD, > 3), and a 70-fold greater activity than BZD. These findings indicate that nitrofuranyl 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.

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 nitroheterocyclic drugs: benznidazole (BZD) and nifurtimox (NFX). Although both drugs are quite effective in curing patients in the acute phase and cases of congenital transmission, the efficacy of both drastically diminishes in the chronic phase, which is the prevalent clinical presentation encountered [4]. The reasons for the marked difference in the drug activity in the two phases of CD are unclear, but they may be related to unfavorable pharmacokinetic properties, such as relatively short terminal half-life and reduced tissue penetration, which might limit their action on the intracellular amastigotes, which prevail in the chronic phase [5]. On the other hand, the acute phase is characterized by high parasitemia and abundance of trypomastigote bloodstream forms. Drug performance can also be affected by individual characteristics of the immunological response of the patient [6]. One additional factor implicated in the low rates of cure of BZD and/or NFX in some patients (acute or chronic phases) is the occurrence of *T. cruzi* strains naturally resistant to these compounds [7,8]. It is worth noting that the resistance or sensitivity to the available drugs is an intrinsic characteristic of a given strain, and is verified in the three developmental stages of the strain (epimastigote, trypomastigote and amastigote) [9-11].

The information outlined above indicates the urgent need for efficacious new drugs active against all phases of CD and all parasite strains. In a previous study, we have reported the designing and synthesis of N'-[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against *T. cruzi*, primarily based on molecular modifications of nifuroxazide (NF), a nitroheterocyclic drug [12,13] (Fig. 1). In those studies, the anti-*T. cruzi* activity was assessed against epimastigote forms of three parasite strains representatives of DTUs TcI, TcII and TcV, which have high prevalence in patients of different Latin American regions [3]. Most of the synthesized compounds showed trypanocidal activity four-to ten-fold higher than BZD.

Herein, we have investigated the activity of the previously reported compounds [12,13] against a fourth strain, Colombiana, which is considered resistant to both BZD and NFX [7]. Structure-activity relationships were established to a set of thirty-six N'- [(5-nitrofuranyl) methylene] analogues employing multivariate chemometric techniques in order to design novel and more active compounds against *T. cruzi*. The explored compounds have in common the (5-nitrofuranyl)methanamine moiety, that is similar to the pharmacophoric group of NFX (rectangles in Fig. 1). The 5-nitrofuranyl group was disclosed as an important structural fragment for anti-trypanosome activity [14,15]. In addition, nitroheterocyclic compounds have been reported as pro-drugs due to the nitro group reduction process that is required to undergo biological response [16,17]. These information about the 5-nitrofuranyl group led us to further investigate N'-[(5-nitrofuranyl) methylene] analogues against trypanosomatids.

Multivariate methods are often applied when more than one variable needs to be observed simultaneously. As complementary methods to recognize patterns in the investigated set of compounds, hierarchical cluster screening (HCS) and principal component analysis (PCA) were employed [18,19]. Based on the findings of these analyses, structure-activity relationships were established. This allowed the designing and synthesis of novel compounds that showed a considerable increase in trypanocidal activity against trypomastigotes and intracellular amastigote forms, the latter evaluated by high content screening (HCS).

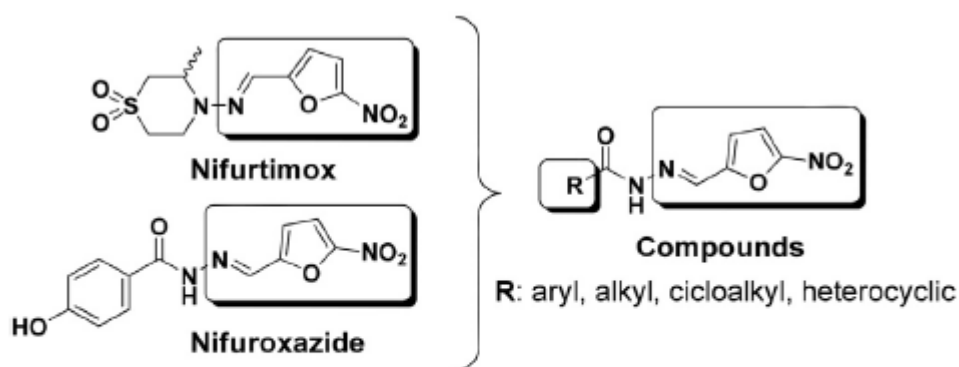


Fig. 1. Nifurtimox (NFX) and nifuroxazide (NF; lead compound) chemical structures and structural scaffold of the designed compounds. Similar structural portions of NFX and NF (rectangles) were maintained in the designed compounds. The molecular modifications in R correspond to aryl, alkyl, cycloalkyl, and heterocyclic groups.

2. Results and discussion

2.1. Biological activity against epimastigote forms of *T. cruzi*

The biological activity of thirty-six N'-[(5-nitrofur-2-yl) methylene] substituted hydrazides against the Colombian strain, which belongs to *T. cruzi* DTU TcI [2], was determined, following protocols previously reported [13]. This activity is expressed as the inhibitory concentration IC_{50} , that corresponds to the drug concentration that inhibits 50% of the epimastigote growth (Table 1; See also Supplementary Material: Dose-response curve of anti-*T. cruzi* activity e epimastigote forms, Colombian strain, p.S3). The activity of eighteen N'-[(5-nitrofur-2-yl) methylene] substituted hydrazides against Silvio X10 c11, Y and Bug 2149 c10 strains has been reported elsewhere [12,13]. Compounds BSF-14 and BSF-31 showed low anti-epimastigote activity and their IC_{50} values could not be determined even with the maximum concentration used in the assay, dictated by the compound solubility.

According to Table 1, eighteen compounds out of thirty-six (50%) were more active than NFX, and thirty-two compounds (89%) were more active than BZD for the Colombian strain. The activity of the same compounds was evaluated against epimastigotes of the Silvio X10 c11 strain (also DTU TcI), indicating that four compounds out of thirty-six (11%) were more active than NFX and twenty-five compounds out of thirty-six (70%), more active than BZD [13] (See Supplementary Material: Table 1S, Biological activity of compounds against four strains of *T. cruzi*). Comparison of the data of both strains evidences that the Colombian strain is more susceptible to the compounds than the Silvio strain, in contrast to what is reported for the reference drugs, BZD and NFX, for which Silvio is more sensitive than Colombian [7].

Furthermore, it is noteworthy that 4-lipophilic-substituted benzene compounds show high anti-parasitic activity. This feature could be related to the presence of a lipophilic pocket in a putative receptor or to facilitated membrane permeation. In contrast, hydrophilic substituents did not show increment of activity. Interestingly, compound BSF-23 [-C₆H₄-4-N(CH₃)₂] exhibited a huge loss of biological activity when compared to its bioisostere BSF-28 [-C₆H₄-4-*tert*-C₄H₉]. This characteristic was previously reported [13], and was mainly attributed to the solvent accessible surface area of hydrophobic atoms (ASA_H), which showed high values for the most active compound (BSF-28) and low values for less active (BSF-23). Thus, the hydrophobicity of 4-substituted benzene seems to be directly related to the anti-*T. cruzi* activity. These observations match with the computational analysis presented below.

In face of the promising anti-*T. cruzi* activity of the compounds and aiming at predicting more active compounds, the experimental data were used as dependent variables to establish qualitative structure-activity relationships.

Table 1
Biological activity of *N*'-[(5-nitrofurán-2-yl) methylene] substituted hydrazides against epimastigote forms of *T. cruzi* Colombiana strain.

Cpd	Substituents (R)	Colombiana (Tcl) IC ₅₀ (μM) (mean ± SD)	Cpd	Substituents (R)	Colombiana (Tcl) IC ₅₀ (μM) (mean ± SD)
BSF-1 ^a	-CH ₃	9.52 ± 1.03	BSF-19 ^a	-C ₆ H ₄ -4-Cl	8.64 ± 0.92
BSF-2	-CH ₂ CN	60.61 ± 6.17	BSF-20 ^a	-C ₆ H ₁₇	8.07 ± 0.78
BSF-3 ^a	-C ₅ H ₁₁	7.58 ± 0.76	BSF-21 ^a	-C ₆ H ₄ -4- <i>iso</i> -C ₃ H ₇	6.08 ± 0.65
BSF-4	-OC ₂ H ₅	7.07 ± 0.74	BSF-22 ^a	-C ₆ H ₄ -4-C ₃ H ₇	7.25 ± 0.75
BSF-5	2-furyl	13.14 ± 1.07	BSF-23 ^a	-C ₆ H ₄ -4-N(CH ₃) ₂	85.53 ± 9.36
BSF-6 ^a	cyclopentyl	9.67 ± 0.93	BSF-24	-C ₆ H ₄ -4-OC ₂ H ₅	11.55 ± 1.15
BSF-7 ^a	-O- <i>tert</i> -C ₄ H ₉	7.41 ± 0.73	BSF-25	-C ₆ H ₄ -3-NO ₂	40.64 ± 4.24
BSF-8 ^a	-C ₆ H ₄	11.30 ± 1.14	BSF-26	2-naphthyl	7.58 ± 0.28
BSF-9	2-thiophene	15.12 ± 1.32	BSF-27 ^a	-C ₆ H ₄ -4-C ₄ H ₉	2.45 ± 0.27
BSF-10 ^a	cyclohexyl	10.19 ± 0.78	BSF-28 ^a	-C ₆ H ₄ -4- <i>tert</i> -C ₄ H ₉	6.10 ± 0.64
BSF-11 ^a	-C ₆ H ₄ -3-CH ₃	8.53 ± 0.80	BSF-29 ^a	-C ₆ H ₄ -4-OC ₃ H ₇	5.26 ± 0.55
BSF-12 ^a	-CH ₂ -C ₆ H ₄	10.06 ± 0.99	BSF-30	-C ₆ H ₄ -3,4-OCH ₃	26.59 ± 2.63
BSF-13 ^a	-C ₆ H ₄ -4-CH ₃	11.92 ± 1.21	BSF-31	-C ₆ H ₄ -4-sulfamoyl	ND
BSF-14	-C ₆ H ₄ -4-NH ₂	ND	BSF-32	-C ₆ H ₄ -3CF ₃	9.98 ± 1.06
BSF-15	-5-4-CH ₃ -1,2,3- thiadiazole	14.24 ± 1.45	BSF-33 ^a	-C ₆ H ₄ -4-NHC ₄ H ₉	3.94 ± 0.43
BSF-16 ^a	-C ₆ H ₄ -4-CN	20.24 ± 2.04	BSF-34 ^a	-C ₆ H ₄ -4-OC ₄ H ₉	2.86 ± 0.31
BSF-17	-C ₆ H ₄ -C ₂ H ₅	6.55 ± 0.69	BSF-35 ^a	-C ₆ H ₄ -4-C ₆ H ₄	3.06 ± 0.23
BSF-18 ^a	-C ₆ H ₄ -4-OCH ₃	8.08 ± 0.85	BSF-36 ^a	-C ₆ H ₄ -2-OC ₆ H ₄	5.79 ± 0.43
NF		187.78 ± 9.91			
BZD		47.91 ± 4.96			
NFX		9.93 ± 1.01			

^a The anti-*T. cruzi* activity of these compounds was previously reported against Silvio X10 c11, Y and Bug 2149 c110 strains [12,13]. IC₅₀: compound concentration that causes a reduction of 50% of parasite growth, compared to controls. IC₅₀ values presented as the mean and the standard deviation (SD), correspond to triplicates from at least two independent experiments. Errors are in a range of 10%. ND: not determined in the maximum concentration used in the assay, without precipitation of compound. Cpd: compounds, NF: nifuroxazide, BZD: benznidazole, NFX: nifurtimox.

2.2. Molecular modelling approach, calculation and selection of descriptors

The crystallographic structure of NF was used as template to construct the three-dimensional (3D) molecular models of each compound in their neutral form, as described [12,13]. The lowest-energy conformer of each compound was selected in the energy equilibrium region of the conformational ensemble profile (CEP) from molecular dynamics (MD) simulations. The root means square deviation (RMSD) was computed as a criterion to verify whether the structural integrity was maintained after simulations by comparing the atomic positions of the selected conformers from CEP and those of the energy-minimized structures (See Fig. 1S, Supplementary Material). The RMSD values found for the lowest-energy conformer of all compounds and the NF template were lower than 0.07 Å. The pharmacophore (5-nitro-2-furan) and the Nacylhydrazone moiety were considered in the structures overlay in order to emphasise the pharmacophore moiety structural integrity for the investigated compounds. Otherwise, higher RMSD values would indicate loss of structural integrity during MD simulations regarding the crystallographic structure used as template [20]. The total potential energy (E_{TOTAL}) was calculated considering the summation of the

following energy contributions: contribution of axial strain energy (E_{STRETCH}), energy input of angular deformation (E_{BEND}), contribution of torsional strain energy (E_{TORS}), energy input of interactions of 1-4 type (E_{1-4}), energy input of van der Waals energy (E_{vdW}), contribution of electrostatic energy (E_{CHARGE}), including the intramolecular energy of solvation (E_{solv}) and the intramolecular energy of hydrogen bonding (E_{Hb}). The values obtained for each energy contribution and for total potential energy can be found in Table 2S of Supplementary Material. The total potential energy values ranged from 4.22 to 67.86 kcal mol⁻¹.

Molecular properties, or descriptors, of different nature (thermodynamic, hydrophobic, electronic, topological, geometric, spectrograph and steric properties) were calculated for each compound, using the methods listed in Table 3S (Supplementary Material). The values of the calculated properties can be found in Table 4S (Supplementary Material).

Table 2
Anti-*T. cruzi* activity of the compounds and reference drug against trypomastigote forms of the Colombiana strain.

	Trypomastigotes (10 ⁵ /mL) ^a	Inhibition of viability (%) ^b
BSF-37	0.1	98.5
BSF-38	0.1	98.5
BSF-39	0.1	98.5
BSF-40	0.1	98.5
NFX	6.3	7.3
Control	6.8	—

The activity values (expressed as log₁/IC₅₀) against epimastigote forms of the four strains were considered as the dependent variable. Because compounds BSF-14 and BSF-31 did not show activity against *T. cruzi*, they were discarded. Thirty-four compounds plus NF were considered to carry out the analysis (n = 35). The activity ranges were evaluated for each strain and, then, common intervals were assigned as follows: log₁/IC₅₀ values from 6.00 to 5.40 as highly active compounds (H); log₁/IC₅₀ values from 5.40 to 4.60 as moderately active (M); log₁/IC₅₀ values from 4.60 to 3.50 as low activity compounds (L).

Table 3
Anti-*T. cruzi* activity and host cell toxicity of the compounds and reference drugs against the amastigote form of the Y strain.

Compounds	Y IC ₅₀ (μM)		U2OS CC ₅₀ (μM)		SI'	Max. Activity (%)
	(mean ± SD)		(mean ± SD)			
BSF-1	4.62	±1.48	39.21	±0.66	8.49	98.68
BSF-3	2.61	±0.15	19.29	±7.39	7.39	114.96
BSF-9	1.06	±0.11	57.18	±9.12	53.94	94.53
BSF-10	2.90	±0.09	25.43	±1.01	8.77	119.43
BSF-16	1.77	±0.27	21.39	±3.90	12.08	95.51
BSF-26	1.87	±1.54	64.20	±12.32	34.33	97.05
BSF-27	1.33	±0.19	19.55	±7.47	14.70	114.96
BSF-28	1.43	±0.40	>200		>140	98.37
BSF-33	0.35	±0.20	12.04	±1.90	34.40	101.80
BSF-34	1.46	±0.39	46.62	±11.80	31.93	114.96
BSF-35	0.71	±0.11	109.07	±23.95	153.62	97.80
BSF-37	1.66	±0.62	>200		>120	102.60
BSF-38	0.96	±0.10	>200		>208	104.24
BSF-39	0.82	±0.12	>200		>244	103.06
BSF-40	0.88	±0.30	>200		>227	98.26
NF	4.26	±1.02	45.69	±23.60	10.73	91.94
BZD	64.34	±39.52	>200		>3	85.16
NFX	5.18	±1.15	85.19	±21.08	16.45	96.60

Y: amastigote form of the Y strain. IC₅₀: concentration of compound which inhibits 50% of amastigotes compared to the control. CC₅₀: concentration of compound which inhibits 50% of U2OS cells, compared to control. U2OS: *Homo sapiens* osteosarcoma cells. SI': selectivity index [SI' = CC₅₀ U2OS/IC₅₀ of Y]. Max. Activity: Maximum Activity of the inhibition of amastigotes, compared to controls. Data presented as mean and standard deviation (SD) of triplicates and at least two independent assays. BZD: benznidazole; NFX: nifurtimox; NF: nifuroxazide (lead compound).

A matrix composed by 35 rows (samples or compounds) and 56 columns (descriptors plus biological activity values) was used as input for studies of structure-property/activity relationships. The descriptors values were autoscaled [21] due to the different orders of magnitude among the molecular properties considered in the analysis. A preliminary variable selection was carried out using as criteria (i) the Pearson's linear correlation coefficient between descriptors and biological activity (cutoff = 0.35), and (ii) data distribution through scatter plots (biological activity, pIC₅₀ values, versus each calculated molecular property or descriptor) [18]. These findings are presented in Fig. 2S of Supplementary Material.

2.3. Exploratory data analysis (hierarchical cluster analysis, HCA, and principal components analysis, PCA)

The unsupervised HCA aims at grouping a data set considering similar attributes. Euclidean distance and complete linking method were used to systematically cluster the samples [18,22]. The similarity index (SI), generated by the data set, varies between 0 and 1, in which 1 corresponds to the maximum similarity. The similarity matrix generates the dendrogram, which is a map shaped tree constructed from the data distances [18,19,21]. According to HCA, 35 samples (34 compounds and NF) were grouped into two major clusters, A and B, sharing 33.9% and 61.2% similarity, respectively (Fig. 2A). Cluster A grouped more hydrophilic compounds with low anti-trypanosomal activity. Compound BSF-23 [-C₆H₄-4-N(CH₃)₂] was grouped with BSF-21 [-C₆H₄-4-*iso*-C₃H₇] into cluster B, probably due to topological similarities. Compounds containing alkyl and heterocyclic substituents (BSF-1 to BSF-7; BSF-9, BSF-10, BSF-12 and BSF-15) grouped mostly in cluster A. Only one alkylsubstituted compound, BSF-20 [-C₈H₁₇], was grouped into cluster B likely due to its

bulky highly lipophilic substituent. The highly active compounds were grouped in the sub-cluster B0 sharing 80.7% similarity. Compound BSF-27 [-C₆H₄-4-C₄H₉] (highly active) was grouped with BSF-28 [-C₆H₄-4-*terc*-C₄H₉] (moderately active) into sub-cluster B'' probably because they are constitutional isomers, but they differ regarding molecular volume.

PCA has the purpose of correlating descriptors in order to find other variables, not only to reduce the descriptors' number, but also to group redundant descriptors in a new set of variables, orthogonal, called principal components (PC) or factors, which describe the information contained in the original data set [18,19,21]. In regard to our data set, the first two factors have described approximately 87% of the total variance from the original data, being 77% discriminated by PC1 (Fig. 2B). In the table of loadings (Fig. 2C) are highlighted the descriptors which most influenced the compounds' discrimination. In PC1, the loading values for stereochemical and geometric (ASA_H, A_{vdw} and V_{vdw}), topological (I_{Platt}, I_{Randic}, I_{HyperWiener}, I_{Szeged}, I_{Wiener}), hydrophobic (ClogP_{WM}), hydrophobic/stereochemistry (RM), and constitutional (no of atoms and MM) properties were higher and similar ranging from 0.25 to 0.29 (absolute values). For PC2, thermodynamic (E_{TOT}; -0.57) and electronic (CHELPG_C6; 0.55) properties showed the highest loading values.

Regarding the score plot (Fig. 2E), PCA and HCA had complementary findings. Compounds with higher values in PC1, or Factor 1 (77%), correspond to the same compounds grouped into cluster B (dendrogram of samples, HCA). Of note, bulkier and more hydrophobic substituents seem to improve the activity against *T. cruzi* epimastigotes.

The diagnosis of possible outliers was carried through plotting sample residual values versus Mahalanobis distance [23]. The confidence interval used was 95%, which is defined internally in Pirouette program [22], and the threshold lines are indicated in red color (Fig. 2D). Generally, samples are considered as outliers when they cross both threshold lines. Compound BSF-6 (five-membered cycloalkyl substituent; moderately active) and NF (similar to phenyl-substituted compounds; low activity) have crossed only one threshold line and were not considered as outliers in this exploratory analysis.

A panel with the activity profile of all compounds (n = 36) against the four *T. cruzi* strains is provided in Fig. 3 to better visualize the activity data, which were used for grouping the compounds regarding the chemical nature of their substituents (Fig. 3). The 4-substituted benzene compounds, mainly those presenting bulky and hydrophobic substituents, showed better activity.

The molecular properties highlighted as important to the antiepipimastigote activity in HCA/PCA approaches (Fig. 2) and the data from the compounds' activity profile regarding the structural nature of substituents (Fig. 3) were considered to choose the representative descriptors (hydrophobic and steric/geometric) to be further exploited. ClogP_{WM} (calculated partition coefficient, water/n-octanol, applying the weighted method) [24-27] and ASA_H (solvent accessible surface area of all hydrophobic atoms) properties can be visualized in Fig. 4, comparing the more active compounds (BSF-27, BSF-33, BSF-34, BSF-35) with the NF lead compound and NFX drug (Fig. 4).

The lipophilicity property is widely investigated in SAR and QSAR approaches. The descriptors of such nature are commonly related to biological activity, since they may express the permeation of a molecule through biological tissues/membranes, as well as interactions with transporter proteins and enzymes [29]. The biological activity against *T. cruzi* has been related to hydrophobic descriptors in previous studies considering compounds of similar structures [13,30,31]. In this regard, comparing BSF-8 [-C₆H₄] and BSF-13 [-C₆H₄-4-CH₃] with the novel 4-alkyl substituted benzene compounds, we verified that the biological activity increases proportionally with the size of the alkyl chain. This suggests the presence of a lipophilic pocket in a putative receptor of the parasite that would better accommodate compounds with greater hydrophobicity.

Maps of lipophilic potential (MLP) were calculated onto a molecular Connolly surface and interpreted according to a color scheme, which ranged from brown (0.13, more lipophilic region) to blue (- 0.13; more hydrophilic region). Regarding the most active compounds, 4-alkyl-substituted benzenes have contributed to increase compound lipophilicity (brown region on the molecular surface of BSF-27, BSF-33, BSF-34, BSF-35; see Fig. 4A). The ASA_H descriptor indicated that the solvent accessible surface area of hydrophobic atoms is bigger for the most active compounds (BSF-27, BSF-33, BSF-34, BSF-35) than for NF and NFX.

2.4. Designing of new compounds, synthesis and biological activity against epimastigote forms

Based on the structure-activity/property findings, we designed four new compounds (See Supplementary material, Fig. 3S: Structure elucidation of 5-nitro-2-furfuriliden derivatives - ^1H and ^{13}C NMR spectra of new compounds). Three compounds (BSF-38 to BSF-40) were designed aiming at increasing the activity against epimastigote forms, and the fourth compound (BSF-37) was designed to evaluate the contribution of benzene ring to the activity. The compounds were synthesized as shown in Scheme 1 (Fig. 5A), and their biological activity was evaluated against epimastigote forms of the four *T. cruzi* strains (Fig. 5B).

The data indicate that all new compounds show increased trypanocidal activity against epimastigote forms of the four strains as compared to the starting compounds (Table 1S of Supplementary Material: Biological activity of compounds against four strains of *T. cruzi*). Regardless the phenotypic differences among the strains [2], the substitution of benzene ring (BSF-38) by cyclohexyl (BSF-37) has no impact on the anti-epimastigote activity. Furthermore, the increase of the aliphatic chain of the 4-substituted 6-membered rings (BSF-37 to BSF-40) improves the activity against the epimastigote forms of the four strains.

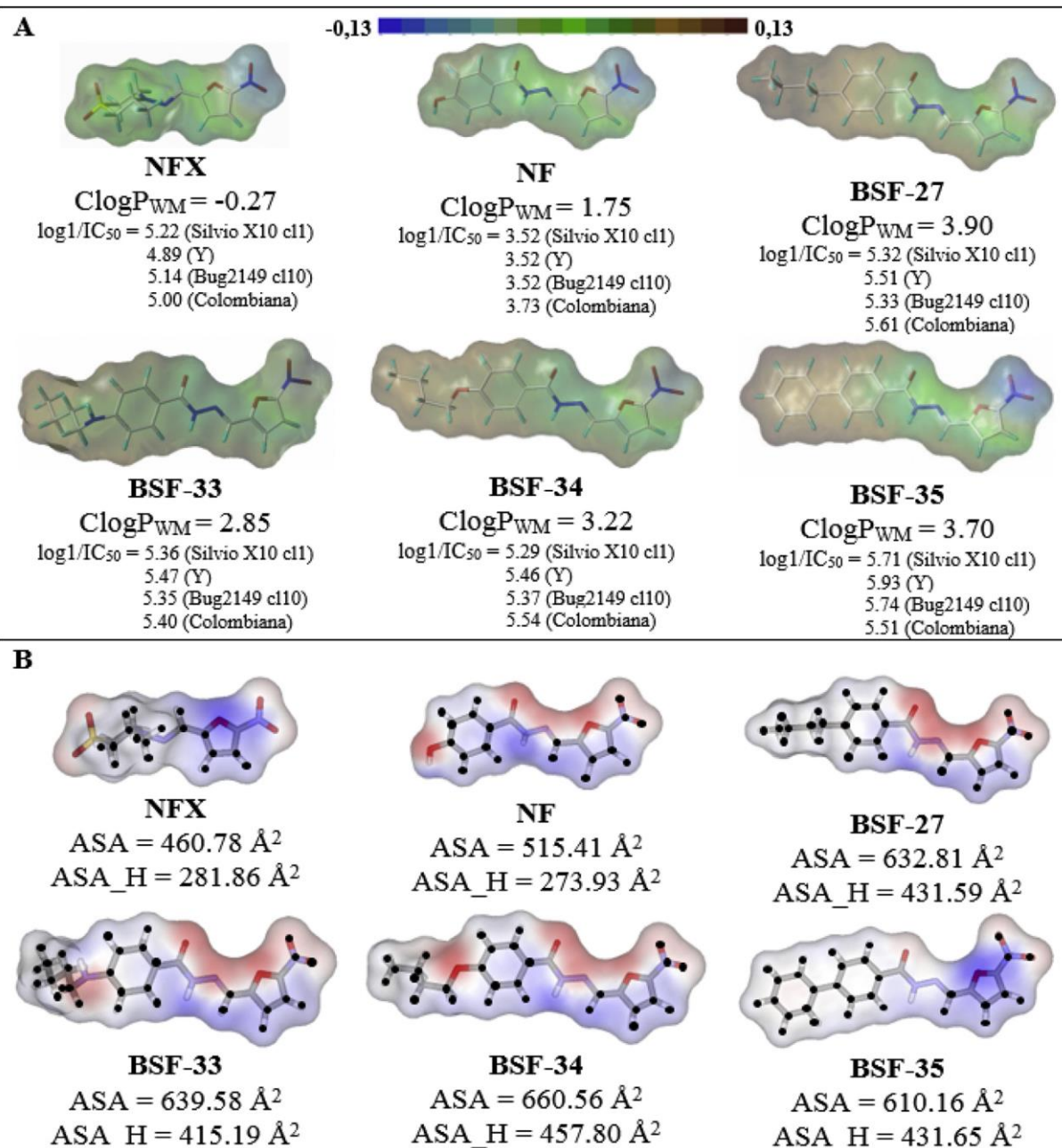


Fig. 4. Representation of the calculated hydrophobic and steric/geometric descriptors for the most active compounds (BSF-27, BSF-33, BSF-34, BSF-35), NF (nifuroxazide) and NFX (nifurtimox): (A) map of lipophilic potential, MLP, calculated using the SYBYL 8.0 package. More hydrophobic regions are shown in brown (0.13) and more hydrophilic regions in blue (-0.13); the $ClogP$ values were calculated using the Marvin program [27], considering equal weights to the methods of VISVANADHAN et al., 1989 Klopman et al., 1993 and PHYSPROP[®] database [24–27]. The compounds are presented in the stick model, where carbon atoms are in light gray, oxygen in red, nitrogen in blue, sulphur in yellow, and hydrogen in green. (B) ASA_H was calculated using ViewerLite 5.0 software [28] employing a probe of 1.4 Å radii (water); the surfaces are displayed as transparent format. The black spots correspond to hydrophobic atoms ($|q_i| < 0.125$; $|q_i|$ is the absolute value of the partial charge of the atom). The compounds are showed in stick model (carbon atoms in gray, oxygen in red, nitrogen in blue, sulphur in yellow and hydrogen in white). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

2.5. Biological activity against trypanostigote forms of *T. cruzi*

As mentioned above, the acute phase of CD is characterized by high parasitemia due to circulating trypanostigote forms. Thus, we evaluated the activity of the new compounds (BSF-37 to BSF-40) and the reference drug NFX against this developmental stage. Trypanostigotes of the Colombiana strain ($10^6/\text{mL}$) were incubated in the absence or presence of the drugs. Percentages of inhibition of trypanostigote viability promoted by the compounds, in relation to the control incubated in the absence of drug were calculated (Table 2).

Compounds were incubated at 1 μM final concentration for 20 h incubation at 37 $^{\circ}\text{C}$; a: values represent the mean of two independent experiments; b: inhibition of viability in relation to the control.

After 20 h incubation in the absence of drug, but in the presence of 0.5% DMSO, we observed 32% inhibition of viable trypomastigote in the control, regarding the initial parasite concentration of 10^6 parasites/mL. This is due to the presence of DMSO and to the fact that trypomastigotes are non-dividing cells. NFX at 1 μM concentration inhibited only 7.3% of parasite viability, whereas the new compounds promoted a drastic inhibition of 98.5%.

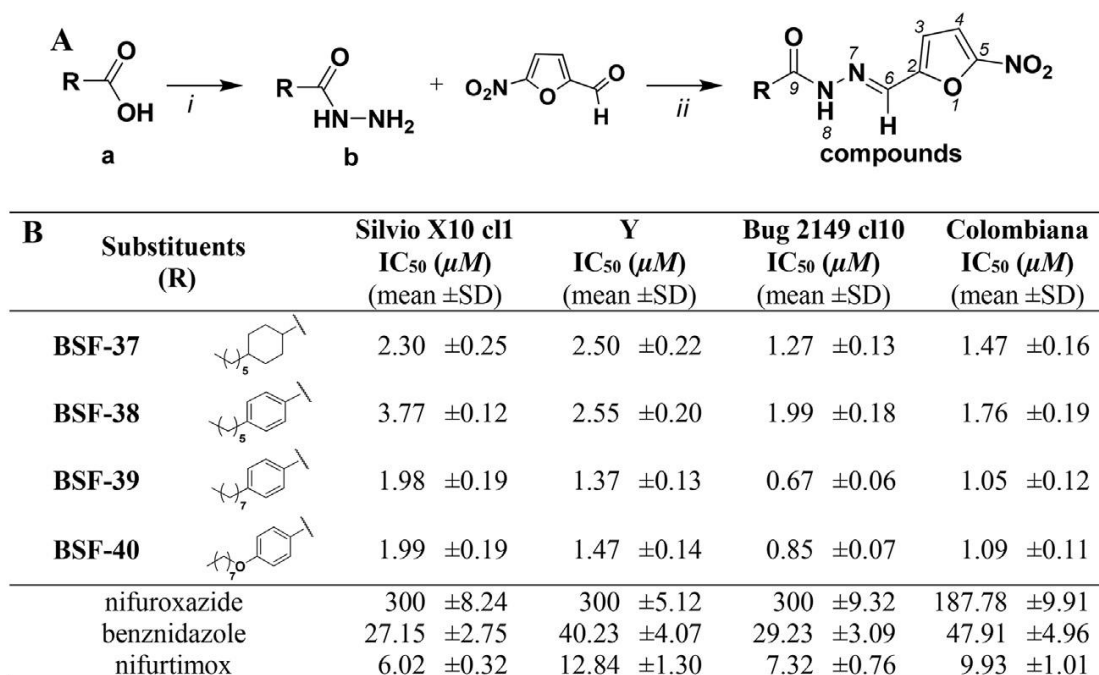


Fig. 5. (A) Scheme 1: synthetic route of 5-nitro-2-furfuliden derivatives. Reaction conditions: (i) CH_3OH , H_2SO_4 /reflux/4 h; N_2H_4 80% in H_2O /75 $^{\circ}\text{C}$ /30 min; (ii) 5-Nitro-2-furaldehyde, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ /r.t./6–8 h. (B) Biological activity of new compounds against epimastigote forms of four *T. cruzi* strains. IC₅₀ value: compound concentration causing 50% reduction in the parasite growth in comparison to controls. IC₅₀ values, presented as mean and standard deviation (SD), correspond to triplicates from at least two independent experiments. Errors are in a range of 10%.

2.6. Biological activity against intracellular amastigote forms of *T. cruzi*

Drug analysis against the intracellular amastigote form has been considered as the most relevant assay to study compounds with anti-*T. cruzi* activity [32], since it more closely represents the *T. cruzi* tissue infection that leads to the development of CD in humans.

Exploratory data analysis (HCA method) was used to assist the selection of compounds to be screened against the amastigote forms. Thereby, compounds were selected to represent each cluster in the dendrogram (Fig. 2A), including the novel four compounds designed posteriorly. Compounds containing substituents of different chemical nature were included in the sample to evaluate whether they have the same tendency against both epimastigote and amastigote forms of *T. cruzi*.

The analysis against amastigote forms was carried out using a high content screening (HCS). This approach is applied in studies of cell signalling, cell physiology, in vitro toxicological tests, enzyme targets, among others [32]. HCS evaluates the antiparasitic activity and cytotoxicity toward host cells based on the determination of parameters such as number of host cells, ratio of infected cells and number of amastigotes in infected cells.

The assays were carried out with the Y strain and the human osteosarcoma cell line U2OS as host cell [33]. The anti-amastigote activity (IC₅₀), the activity on U2OS host cells

(cytotoxicity, CC_{50}) and the selectivity toward amastigotes (selectivity index, SI') were determined (Table 3).

It was observed that the most active compounds were very selective, with SI' values greater than 200, in contrast to the values of reference drugs: SI' for NFX = 16.45 and BZD >3. Furthermore, it was observed high correlation between results obtained for the same compounds against epimastigote (Table 1S of Supplementary Material: Biological activity of compounds against four strains of *T. cruzi*) and amastigote forms of the Y strain, reaching a correlation value of 0.786 (Spearman's non-parametric correlation method). Considering results obtained against amastigote forms, the same behavior was observed for BSF-37 and BSF-38 compounds ($P = 0.137$; statistical analysis - *Student's t*-test, unpaired) meaning that they do not have significant differences of activity on amastigote forms. The novel designed compounds having the benzene ring (BSF-38 to BSF-40) had similar anti-amastigote activity values ($P = 0.694$, one-way variance analysis, oneway-ANOVA, with 95% of confidence interval).

Among the most active compounds, compound BSF-39 [$-C_6H_4-4-C_7H_{15}$] showed the best selectivity to the amastigotes in relation to the host cell. Representative images obtained for infected cells treated with this compound at the concentration of 1.56 μ M showed that the typical morphology of U2OS cell was maintained and no amastigote forms were present (Fig. 6). Few intracellular parasites were still observed when BSF-39 was added at 0.39 μ M concentration (Fig. 6). The data obtained with the reference drug BZD at 1.56 μ M indicated the presence of abundant intracellular parasites (Fig. 6) (See also Fig. 4S of Supplementary Material). The dose-response curves obtained for each compound selected in the assays against the amastigote forms are found in Fig. 5S of Supplementary Material.

3. Conclusion

Based on the findings from exploratory data analysis, four new compounds were designed and synthesized, and their activity was evaluated against trypomastigotes and intracellular amastigotes. Our findings indicate that the novel compounds are active and selective for the three developmental forms of *T. cruzi*: epimastigotes, trypomastigotes and intracellular amastigotes. These results stimulate further studies on N'-(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides as potential drug candidates to treat Chagas disease.

4. Experimental sections

4.1. Chemistry

NMR spectra were recorded on a Bruker ADPX Advanced (300 MHz) spectrometer employing DMSO- d_6 solutions with tetramethylsilane as internal standard. Melting points were determined using Büchi M 560 apparatus and elemental analysis was performed on a Perkin-Elmer 24013 CHN Elemental Analyzer. Synthesis and anti-*T. cruzi* active of compounds BSF-13, BSF-18 [12]; BSF-1, BSF-3, BSF-6, BSF-7, BSF-8, BSF-10, BSF-11, BSF-12, BSF-16, BSF-19, BSF-20, BSF-21, BSF-22, BSF-23, BSF-27, BSF-28, BSF-29, BSF-33, BSF-34, BSF-35, BSF-36 [13], was previously reported by our group.

4.1.1. General procedure for the synthesis of hydrazides (b)

Carboxylic acid (I) (0.02 mol) was refluxed for 4 h in 20.0 mL (0.49 mol) of anhydrous methanol and 0.5 mL (0.01 mol) of sulphuric acid. The reaction mixture was cooled down to room temperature and the hydrazine hydrate 80% (v/v) (10.0 mL, 0.13 mol) was added. The system was maintained by vigorously stirring for more 30 min in reflux. After

this period, the mixture was maintained at low temperature to give II and was purified from ethyl acetate. The hydrazone intermediate of compounds 1 and 2 were commercially obtained (Sigma-Aldrich, purity of 97%) [34,35].

4.1.2. General procedure for the synthesis of nitrofurans compounds

Were synthesized by refluxing 5-nitro-2-furaldehyde 98% (5 mmol) and hydrazides II (5 mmol) in water, sulphuric acid, acetic acid, and methanol (8:7:8:20 v/v) for 1 h. After cooling, the mixture was poured into cold water to precipitate and purified by recrystallization from acetonitrile [36]. Compounds with high water solubility were synthesized in 10 mL of ethanol PA (5 mmol) with 5-nitro-2-furaldehyde 98% (1 mmol) and hydrazides II (1 mmol) at room temperature and vigorous stirring for 6-8 h [37]. Compounds BSF-26, BSF-37, BSF-38, BSF-39, BSF-40 was identified as a new chemical entity and is described following.

4.1.2.1. 4-pentyl-N'-[(5-nitro-2-furyl)methylene]cyclohexane carbohydrazone (BSF-37).

Light yellow solid (91%); mp 169-170 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 11.67/11.50 (s, 1H, H8), 8.17/7.93 (s, 1H, H6), 7.76 (d, 1H, J_(4,3) = 3.8 Hz, H4), 7.18 (d, 1H, J_(3,4) = 3.2 Hz, H3), 3.07/2.18 (t, 1H, J = 12 Hz, H10), 1.79 (d, 4H, J = 10.5 Hz, H11, H15), 1.47-1.19 (m, 11H, H3, H18, H19 - Hax. e H16, H17 Hax./eq.), 0.95-0.84 (m, 5H, H18, H19 (Heq.), H20 (CH₃)); ¹³C NMR {H} (DMSO- *d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 177.3/172.2 (C9), 152.0 (C2), 151.9 (C5), 133.8/130.5 (C6), 114.6 (C4), 114.0 (C3), 43.1/36.4 (C10), 36.7 (C16), 36.6 (C13), 32.0 (C12), 31.9 (C14), 31.6 (C18), 28.8 (C11), 28.3 (C15), 25.9 (C17), 22.1 (C19), 13.9 (C20); Anal. Calcd. For (C₁₇H₂₅N₃O₄): C, 60.88; H, 7.51; N, 12.53. Found: C, 60.58; H, 7.20; N, 12.16.

4.1.2.2. 4-pentyl-N'-[(5-nitro-2-furyl)methylene]benzohydrazone (BSF-38). Yellow solid

(η 94%); mp 200-201 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.15 (s, 1H, H8), 8.41 (s, 1H, H6), 7.84 (d, 2H, J = 7.7 Hz, H11, H15), 7.79 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H4), 7.36 (d, 2H, J = 7.9 Hz, H12, H14), 7.26 (d, 1H, J = 3.3 Hz, H3), 2.65 (t, 2H, J = 7.5 Hz, H16), 1.60 (t, 2H, J = 6.9 Hz, H17), 1.30 (d, 4H, H18, H19), 0.86 (t, 3H, J = 6.6 Hz, H20); ¹³C NMR {H} (DMSO-*d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163.3 (C9), 151.9 (C2, C5), 147.0 (C13), 135.1 (C6), 130.2 (C10), 128.4 (C11, C15), 127.8 (C12, C14), 115.0 (C4), 114.6 (C3), 34.9 (C16), 30.8 (C17), 30.3 (C18), 21.9 (C19), 13.8 (C20); Anal. Calcd. For (C₁₇H₁₉N₃O₄, 329.35 g): C, 62.0; H, 5.81; N, 12.76. Found: C, 61.94; H, 5.73; N, 12.45.

4.1.2.3. 4-heptyl-N'-[(5-nitro-2-furyl)methylene]benzohydrazone (BSF-39). Yellow solid

(η 92%); mp 178-179 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.15 (s, 1H, H8), 8.42 (s, 1H, H6), 7.85 (d, 2H, J = 7.6 Hz, H11, H15), 7.79 (d, 1H, J = 3.0 Hz, H4), 7.35 (d, 2H, J = 7.7 Hz, H12, H14), 7.26 (s, 1H, H3), 2.65 (t, 2H, J = 7.2 Hz, H16), 1.59 (s, 2H, H17), 1.28 (s, 8H, H18-H21), 0.86 (s, 3H, H22); ¹³C NMR {H} (DMSO- *d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 163.3 (C9), 151.9 (C2), 151.8 (C5), 147.0 (C13), 135.2 (C6), 130.2 (C10), 128.4 (C11, C15), 127.9 (C12), 127.8 (C14), 115.0 (C4), 114.6 (C3), 35.0 (C16), 31.2 (C20), 30.6 (C17), 28.5 (C18), 28.4 (C19), 22.0 (C21), 13.8 (C20); Anal. Calcd. For (C₁₉H₂₃N₃O₄, 357.470 g): C, 63.85; H, 6.49; N, 11.76. Found: C, 63.58; H, 6.39; N, 11.38.

4.1.2.4. 4-heptyloxy-N'-[(5-nitro-2-furyl)methylene]benzohydrazone (BSF-40). Yellow solid

(η 88%); mp 172-173 °C. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 300 MHz): δ (ppm): 12.09 (s, 1H, H8), 8.41 (s, 1H, H6), 7.91 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H11, H15), 7.79 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H4), 7.24 (d, 1H, J = 3.9 Hz, H3), 7.06 (d, 2H, J = 8.8 Hz, H12, H14), 4.05 (t, 2H, J = 6.3 Hz, H17), 1.78-1.71 (m, 2H, H18), 1.42-1.28 (m, 8H, H19- H22), 0.87 (s, 3H, J = 6.9 Hz, H23); ¹³C NMR {H} (DMSO- *d*₆, 75 MHz): δ (ppm): 161.8 (C9), 160.0 (C13), 152.0 (C2), 151.8 (C5),

134.7 (C6), 129.9 (C11), 129.8 (C15), 124.5 (C10), 114.8 (C4), 114.6 (C3), 114.2 (C12, C14), 67.8 (C17), 31.2 (C21), 28.5 (C18), 28.4 (C20), 25.4 (C19), 22.0 (C22), 13.9 (C23); Anal. Calcd. for (C₁₉H₂₃N₃O₅, 373,40 g): C, 61.11; H, 6.21; N, 11.25. Found: C, 60.99; H, 5.96; N, 10.87.

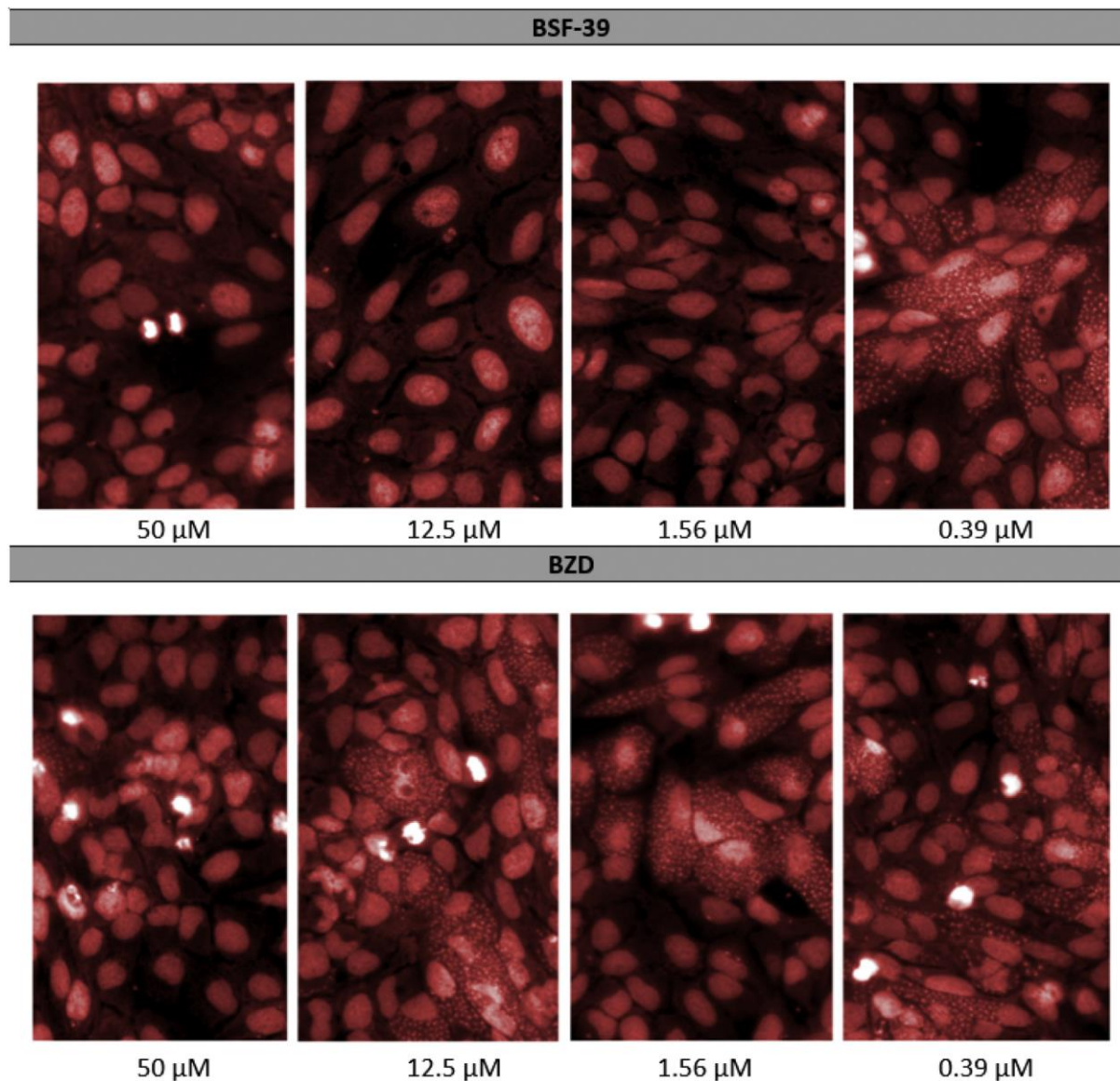


Fig. 6. Images obtained by high content screening (HCS) for BSF-39 [-C6H4-4-C7H15]- and benznidazole-treated infected U2OS cells at 50, 12.5, 1.56 and 0.39 μ M concentrations. Assays performed with the Y strain, in U2OS cells and incubation for 72 h. Host cell and parasite DNA are stained with Draq5 (Biofocus).

4.2. Biological activity against epimastigote forms of *T. cruzi* strains

In vitro anti-*T. cruzi* activity assays were performed against the epimastigote forms of Silvio X10 cl1, Y, Bug 2149 cl10 and Colombiana strains, as described elsewhere [13]. Exponentially growing epimastigotes (1.0×10^7 parasites/mL) were incubated in 96-well, flat-bottom tissue culture plates in 200 μ L LIT-FCS medium with different drug concentrations for 72 h at 28 °C. The nitro derivatives, BZ and NFX standard drugs, and the lead compound NF were dissolved in DMSO and diluted into LIT-FCS medium to obtain a concentration from 0.4 to 300.0 μ M. DMSO concentration in the medium did not exceed 1.0%. After the incubation period, the amount of viable parasites was determined from the absorbance

measurements in a microplate reader (Biochrom - EX Read 400, England), at 562 nm wavelength. The assays were performed in triplicate and, at least, in two independent experiments. The anti-*T. cruzi* activity was calculated by using the formula: $PGI = \{1 - [(A_p - A_{pb}) / (A_c - A_{cb})]\} \times 100$, where: PGI = percentage of growth inhibition; $A_p = A_{562}$ of the culture at a given compound concentration after 72 h incubation; $A_{pb} = A_{562}$ of the medium at a given compound concentration without parasites (blank of compounds in each concentration); $A_c = A_{562}$ of the culture in the absence of any compound; $A_{cb} = A_{562}$ of the LIT-FCS medium (blank). The inhibitory concentration IC_{50} , corresponding to the drug concentration that inhibited 50% parasite growth, was calculated from the percentage of growth inhibition using nonlinear model growth/sigmoid dose-response for each case using, at least, six concentration values [38,39].

4.3. Molecular modelling approach, calculation and selection of descriptors

The 3D molecular models of the compounds were built up using the Cartesian coordinates of crystallized structure of the lead compound NF (LEQTAC code, $R_{\text{factor}} = 0.11$) [40] retrieved from the Cambridge Structural Database (CSD) as reference geometry [41]. Each molecular model was energy-minimized in the MM + force field [42], without any constraints. The partial atomic charges were calculated employing the AM1 (Austin Model 1) semiempirical method [43]. The energy minimization of the 3D molecular models was also performed employing the MOLSIM 3.2 program [44] by applying the steepest descent and, subsequently, the conjugated gradient method, using a convergence criterion of 0.01 kcal/mol. The energy-minimized structures were the input to the MD simulations of 1 ns (1,000,000 steps; step size of 1 fs) at 301 K (28 °C), the same temperature of the biological assay. Dielectric constant of 3.5 was used to simulate the environment of the biological membranes. It was assigned a fictitious atomic mass of 5000 u.m.a. to some atoms position in order to maintain the structural integrity of the molecular models during simulation, based on the ^1H and ^{13}C NMR and NF crystallized structure. Trajectory files were recorded every 20 simulation steps to generate 50,000 conformations. The lowest-energy conformation was selected from the equilibrium region of conformational ensemble profile (CEP) and compared to the initial energy-minimized molecular model to verify whether the structural integrity was maintained after simulation. The RMSD value was used as criterion employing the Hyperchem 8.0 program [41]. The energy minimization procedure was made in MOLSIM 3.2 program [44], applying the steepest descent and conjugated gradient methods and the convergence criterion was 0.01 kcal/mol. At this time, some thermodynamic properties were obtained as follows: the total potential energy from minimization step (E_{total}); the intramolecular energy contribution of solvation (E_{solV}), applying the hydration shell model proposed by Forsythe and Hopfinger (1973) [45]; and, the intramolecular energy contribution of hydrogen bonding (E_{Hb}). The resulting 3D molecular model for each compound was the input structure to the calculation of physicochemical and structural properties, which were explored in this study.

The electronic properties as Charges from Electrostatic Potentials using a Grid based method (CHELPG) [46], dipole moment (total and x, y, z) and frontier molecular orbital energy (E_{HOMO} and E_{LUMO}) were calculated using the B3LYP 6.311 ++ (d,p) method [47-49] implemented in the Gaussian 03W program [50].

The Marvin 5.2.1_1 program [27] was used to calculate steric, topological/geometric, and lipophilic properties. ClogP_{WM} was calculated by the weighted method, assigning equal weight for each method [24-26].

Further detailed information regarding all descriptors, methods, and respective software used to perform these calculations are listed in Table 3S of Supplementary Material.

The independent variables or descriptors or molecular properties of different nature were calculated and generated a matrix containing 56 columns (independent variables or descriptors plus biological activity (\log_1/C)) and 36 rows corresponding to the number of compounds.

Procedure to select the most representative molecular properties: two filters were used as criteria to previously select the independent variables: (i) the Pearson correlation coefficient and (ii) a visual inspection of scatter plots for biological activity versus each variable or descriptor or molecular property [18]. The Pearson correlation coefficient value of 0.35 was formerly used as cut off for selecting the calculated independent variables. Regarding the visual inspection, only variables presenting uniform distribution and linear tendency with the biological data were selected to compose the final matrix.

The final matrix was used as input for the exploratory data analysis. Due to the distinct magnitude orders among the calculated variables, the autoscaling procedure was applied as a preprocessing method [21].

4.4. Exploratory data analysis [18,19]

4.4.1. Hierarchical cluster analysis, HCA

HCA was performed using the Pirouette 3.11 program [22], employing the complete linkage method and Euclidean distance. In HCA, distances between pairs of samples (or variables) are calculated and compared. When distances between samples are relatively small, this implies that the samples are similar. The calculated distances between samples were set on a similarity matrix whose elements are called similarity indices, ranging between 0 and 1, where 1 is equivalent to a maximum similarity. The results are usually presented as a two-dimensional chart, called dendrogram [22].

The multivariate distance d_{ab} between two samples vectors, a and b, was determined by computing differences at each of the m variables:

$$d_{ab} = \left[\sum_i^m (x_{aj} - x_{bj})^M \right]^{1/M}$$

M is the order of the distance, and here corresponds to the Euclidean distance ($M = 2$) [22]. Because of inter-sample distances can vary with the type and number of measurements, it is customary to transform them onto a somewhat more standard scale of similarity, where d_{max} is the largest distance in the data set:

$$similarity_{ab} = 1 - \frac{d_{ab}}{d_{max}}$$

HCA was carried out for samples and variables. In the first case, biological activity was considered as dependent variable. In the second option, the biological activity is considered as independent variable [18,19,22].

4.4.2. Principal components analysis, PCA

The exploratory analysis of PCA was also carried out employing the Pirouette 3.11 software [22]. For PCA, the biological activity was considered as the dependent variable. The data were decomposed into two matrices, one of scores related to the samples, and another of loadings, related to the variables [18,19].

The new set of axes generates the PCs, or factors, into which are the information related to the original descriptors. Thus, the number of PCs that explain most of the variability in the data set can be determined, considering that these PCs are uncorrelated and mutually orthogonal variables built up as simple linear combinations from the original data. In this exploratory data analysis, PCA was run up to ten factors or PCs. The outliers' diagnosis, implemented in Pirouette 3.11 software [22], was also performed through the Mahalanobis distance [51].

4.5. Biological activity against trypomastigote forms of *T. cruzi*

Trypomastigote forms of the Colombiana strain were obtained from the supernatant of infected LLC-MK₂ cells. After centrifugation at 7000 rpm at 4 °C, the parasites (10⁶ cells/mL) were resuspended in DME medium supplemented with 2% FCS and added to 96-well, flat-bottom tissue culture plates in the absence or presence of 1 μM of different compounds for 20 h at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. DMSO concentration in the medium was 0.5%. After incubation, the viability of the parasites was examined by motility under a light microscope. The number of live parasites was quantified in a Neubauer chamber. The percentage of inhibition of trypomastigote viability promoted by the compounds was calculated in relation to the control incubated in the absence of drug. The assay was performed in two independent experiments.

4.6. Biological activity against amastigote forms of *T. cruzi*

Test and reference compounds were diluted in the proper volume of 100% DMSO, to prepare 10 mM stock solutions. Aliquots of all solutions were kept frozen at - 80 °C, protected from light, and submitted for a maximum of 3 cycles of freezing-thawing.

The HCS assay was performed against intracellular amastigote as described in Moraes et al., 2014 [15]. Briefly: on day 1, U2OS cells were seeded in black μClear 384 well tissue culture treated polystyrene plates (Greiner Bio-One) at 700 cells in 40 μL of high glucose DME medium (Hyclone) supplemented with 10% of FBS and a penicillin/streptomycin solution (Gibco Thermo Fisher Scientific). After 24 h of microplate incubation at 37 °C, 5% CO₂ and controlled humidity, trypomastigotes of Y strain were harvested from infected LLC-MK₂ cells and added to the U2OS-containing 384 microplate at 2800 trypomastigotes in 10 μL of low glucose DME medium (supplemented as above) per well.

On day 3, 10 μL of compound solution (14 points in a 2-fold dilution scheme) were transferred onto the assay plates containing *T. cruzi*-infected U2OS cells, reaching the highest concentration of 200 μM and 1% DMSO for each compound, and the final assay volume of 60 μL. Each compound concentration was tested in doublets, and each experiment was performed in duplicate. At the assay endpoint, microplates were fixed with 4% PFA and stained with 5 μM Draq5 (Biofocus). Images were acquired using the Operetta High Content System (Perkin Elmer) with the objective lens of 20× WD magnification. The high content analysis was performed using the Harmony software (Perkin Elmer). Several parameters, such as host cells number, infection ratio and number of parasites per infected cell, were determined. For the purpose of this study, the infection ratio (IR) was defined as the ratio between the total number of infected cells from the well and the total number of cells from the same well. The raw data for IR values were normalized to negative (infected cells, DMSO-mock treated) and positive (not infected cells) controls to determine the normalized antiparasitic activity. Activity values were processed with the Graphpad Prism software, version 7, for generation of sigmoidal dose-response (variable slope) nonlinear curve fitting and determination of EC₅₀ and CC₅₀ values by interpolation.

For the purpose of this study, IC₅₀ was defined as the compound concentration corresponding to 50% normalized activity (reduction of infection) after 72 h of compound incubation. Potency relates to the IC₅₀ values - the more potent the compound, the lower is its IC₅₀ - whereas efficacy relates to the maximum observed activity of a compound and the more efficacious the compound, the closer its maximum activity is from 100%. Cytotoxicity was measured in terms of CC₅₀ value, defined as the compound concentration corresponding to reduction of 50% in the number of cells in comparison with negative controls (DMSO-treated). Both for IC₅₀ and CC₅₀ values were determined by interpolation to the dose-response curves. The selectivity index was defined as the ratio between the CC₅₀ and the IC₅₀ values obtained for a given compound.

Acknowledgements

The authors thank Professor Maria Júlia Manso Alves of the Laboratory of Biochemical Parasitology, Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo (USP) for providing the epimastigote forms of *T. cruzi* Y strain and LIT medium. This work was supported by grants of Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (grants number 2013/13333-8 and 2014/06061-4) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (grants number 304793/2009-4 and 472739/2013-1). CHF, MB and SLN are recipient of fellowships from CNPq (grants number 870448/1997-8, 163670/2015-3, and 501189/2013-0, respectively).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.12.011>.

References

- [1] J.R. Coura, P.A. Viñas, Chagas disease: a new worldwide challenge, *Nature* 465 (2010) S6-S7.
- [2] B. Zingales, S.G. Andrade, M.R.S. Briones, D.A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI, *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 104 (2009) 1051-1054.
- [3] B. Zingales, M.A. Miles, C.B. Moraes, A. Luquetti, F. Guhl, A.G. Schijman, I. Ribeiro, Drug discovery for Chagas disease should consider *Trypanosoma cruzi* strain diversity, *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 109 (2014) 828-833.
- [4] A. Rassi, J.M. de Rezende, American trypanosomiasis (Chagas disease), *Infect. Dis. Clin. N. Am.* 26 (2012) 275-291.
- [5] J.A. Urbina, Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches, *Acta trop.* 115 (2010) 55-68.
- [6] M.D. Lewis, J.M. Kelly, Putting infection dynamics at the heart of Chagas disease, *Trends Parasitol.* 32 (2016) 899-911.
- [7] L.S. Filardi, Z. Brener, Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81 (1987) 755-759.
- [8] S.G. Andrade, A. Rassi, J.B. Magalhaes, F. Ferriolli Filho, A.O. Luquetti, Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and

experimental animals inoculated with the same strains, *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 86 (1992) 624-626.

[9] B. Zingales, *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity, *Acta trop.* xx (2017) xxxx-xxxx, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.09.017>.

[10] S. Croft, In vitro screens in the experimental chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis, *Parasitol. Today* 2 (1986) 64-69.

[11] M. Moreno, D.A. D'ávila, M.N. Silva, L. Galvão, A.M. Macedo, E. Chiari, E.D. Gontijo, B. Zingales, *Trypanosoma cruzi* benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease, *Memórias do Inst. Oswaldo Cruz* 105 (2010) 918-924.

[12] F. Palace-Berl, S.D. Jorge, K.F.M. Pasqualoto, A.K. Ferreira, D.A. Maria, R.R. Zorzi, L. de Sá Bortolozzo, J.Â.L. Lindoso, L.C. Tavares, 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti- *Trypanosoma cruzi* agents: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 5395-5406.

[13] F. Palace-Berl, K.F.M. Pasqualoto, S.D. Jorge, B. Zingales, R.R. Zorzi, M.N. Silva, A.K. Ferreira, R.A. de Azevedo, S.F. Teixeira, L.C. Tavares, Designing and exploring active N0-[(5-nitrofuranyl) methylene] substituted hydrazides against three *Trypanosoma cruzi* strains more prevalent in Chagas disease patients, *Eur. J. Med. Chem.* 96 (2015) 330-339.

[14] P. Hernandez, R. Rojas, R.H. Gilman, M. Sauvain, L.M. Lima, E.J. Barreiro, M. González, H. Cerecetto, Hybrid furoxanyl N-acylhydrazones derivatives as hits for the development of neglected diseases drug candidates, *Eur. J. Med. Chem.* 59 (2013) 64-74.

[15] C.B. Moraes, M.A. Giardini, H. Kim, C.H. Franco, A.M. Araujo-Junior, S. Schenkman, E. Chatelain, L.H. Freitas-Junior, Nitroheterocyclic compounds are more efficacious than CYP51 inhibitors against *Trypanosoma cruzi*: implications for Chagas disease drug discovery and development, *Sci. Rep.* 4 (2014), <https://doi.org/10.1038/srep04703>.

[16] S.R. Wilkinson, M.C. Taylor, D. Horn, J.M. Kelly, I. Cheeseman, A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105 (2008) 5022-5027.

[17] B.S. Hall, C. Bot, S.R. Wilkinson, Nifurtimox activation by trypanosomal type I nitroreductases generates cytotoxic nitrile metabolites, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 13088-13095.

[18] M. Ferreira, Multivariate QSAR, *J. Braz. Chem. Soc.* 13 (2002) 742-753.

[19] K.R. Beebe, R.J. Pell, M.B. Seasholtz, *Chemometrics: a Practical Guide*, Wiley-Interscience, New York, 1998.

[20] J.C. Baber, D.C. Thompson, J.B. Cross, C. Humblet, GARD: a generally applicable replacement for RMSD, *J. Chem. Inf. Model.* 49 (2009) 1889-1900.

[21] M. Ferreira, A.M. Antunes, M.S. Melgo, P.L.O. Volpe, *Quimiometria I: calibração multivariada, um tutorial*, *Quím. Nova* 22 (1999) 724-731.

[22] PIROUETTE 3.11, Infometrix Inc., Woodinville, WA, 1990-2003.

[23] P.C. Mahalanobis, On the generalized distance in statistics, in: *Proceedings of the National Institute of Sciences of India*, New Delhi, 1936, pp. 49-55.

[24] V.N. Viswanadhan, A.K. Ghose, G.R. Revankar, R.K. Robins, Atomic physicochemical parameters for three dimensional structure directed quantitative structure-activity relationships. 4. Additional parameters for hydrophobic and dispersive interactions and their application for an automated superposition of certain naturally occurring nucleoside antibiotics, *J. Chem. Inf. Model.* 29 (1989) 163-172.

[25] G. Klopman, J.-Y. Li, S. Wang, M. Dimayuga, Computer automated log P calculations based on an extended group contribution approach, *J. Chem. Inf. Model.* 34 (1994) 752-781.

[26] PHYSPROP database. <http://www.syrres.com/what-we-do/databaseforms.aspx?id=386>.

- [27] Marvin Beans, version 5.2.1_1; ChemAxon Ltd.: 1998-2010, Budapest, Hungary.
- [28] VIEWERLITE 5.0, Accelrys Inc., 2000.
- [29] C.G. Wermuth, The Practice of Medicinal Chemistry, Academic Press, Oxford, 2008.
- [30] S.D. Jorge, F. Palace-Berl, K.F. Mesquita Pasqualoto, M. Ishii, A.K. Ferreira, C.M. Berra, R.V. Bosch, D.A. Maria, L.C. Tavares, Ligand-based design, synthesis, and experimental evaluation of novel benzofuroxan derivatives as anti- *Trypanosoma cruzi* agents, *Eur. J. Med. Chem.* 64 (2013) 200-214.
- [31] F. Palace-Berl, S.D. Jorge, K.F.M. Pasqualoto, A.K. Ferreira, D.A. Maria, R.R. Zorzi, L. de Sá Bortolozzo, J.Â.L. Lindoso, L.C. Tavares, 5-Nitro-2-furfuriliden derivatives as potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents: design, synthesis, bioactivity evaluation, cytotoxicity and exploratory data analysis, *Bioorg. Med. Chem.* 21 (2013) 5395-5406.
- [32] J.M. Zock, Applications of high content screening in life science research, *Comb. Chem. high throughput Screen.* 12 (2009) 870-876.
- [33] J. Ponten, E. Saksela, Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours, *Int. J. cancer* 2 (1967) 434-447.
- [34] S.D. Jorge, F. Palace-Berl, A. Masunari, C.A. Cechinel, M. Ishii, K.F.M. Pasqualoto, L.C. Tavares, Novel benzofuroxan derivatives against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* strains: design using Topliss' decision tree, synthesis and biological assay, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 5031-5038.
- [35] C.-K. Li, Y.-J. Ma, L.-H. Cao, Synthesis of novel 3-Acetyl-2-aryl-5-(3-aryl-1-phenyl-pyrazol-4-yl)-2, 3-dihydro-1, 3, 4-oxadiazoles, *J. Chin. Chem. Soc.* 56 (2009) 182-185.
- [36] L.C. Tavares, T.C. Penna, A.T. Amaral, Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs, *Boll. Chim. Farm.* 136 (1997) 244-249.
- [37] C.F. Da Costa, A.C. Pinheiro, M.V. De Almeida, M. Lourenço, M.V. De Souza, Synthesis and antitubercular activity of novel amino acid derivatives, *Chem. Biol. drug Des.* 79 (2012) 216-222.
- [38] M. Ishii, S.D. Jorge, A.A. Oliveira, F. Palace-Berl, I.Y. Sonehara, K.F.M. Pasqualoto, L.C. Tavares, Synthesis, molecular modeling and preliminary biological evaluation of a set of 3-acetyl-2, 5-disubstituted-2, 3-dihydro-1, 3, 4-oxadiazole as potential antibacterial, anti-*Trypanosoma cruzi* and antifungal agents, *Bioorg. Med. Chem.* 19 (2011) 6292-6301.
- [39] H. Cerecetto, R. Di Maio, M. González, M. Risso, P. Saenz, G. Seoane, A. Denicola, G. Peluffo, C. Quijano, C. Olea-Azar, 1, 2, 5-Oxadiazole N-oxide derivatives and related compounds as potential antitrypanosomal drugs: structure-activity relationships, *J. Med. Chem.* 42 (1999) 1941-1950.
- [40] B. Pniewska, M. Januchowski, Structural investigation of nifuroxazide, p-hydroxy-N',-(5-nitrofurfurylidene) benzhydrazide, *Pol. J. Chem.* 72 (1998) 2629-2634.
- [41] HYPERCHEM Program for Windows, Hypercube, Inc., Gainesville, FL, 2008.
- [42] N.L. Allinger, Conformational analysis. 130. MM2. A hydrocarbon force field utilizing V1 and V2 torsional terms, *J. Am. Chem. Soc.* 99 (1977) 8127-8134.
- [43] M.J. Dewar, E.G. Zoebisch, E.F. Healy, J.J. Stewart, Development and use of quantum mechanical molecular models. 76. AM1: a new general purpose quantum mechanical molecular model, *J. Am. Chem. Soc.* 107 (1985) 3902-3909.
- [44] D. Doherty, MOLSIM: Molecular Mechanics and Dynamics Simulation Software-user's Guide, Version 3.2, The Chem21 Group Inc., Lake Forest, 1997.
- [45] K. Forsythe, A. Hopfinger, The influence of solvent on the secondary structures of poly (L-alanine) and poly (L-proline), *Macromolecules* 6 (1973) 423-437.
- [46] C.M. Breneman, K.B. Wiberg, Determining atom-centered monopoles from molecular electrostatic potentials. The need for high sampling density in formamide conformational analysis, *J. Comput. Chem.* 11 (2004) 361-373.

- [47] A.D. Becke, Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior, *Phys. Rev. A* 38 (1988) 3098.
- [48] C. Lee, W. Yang, R.G. Parr, Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula into a functional of the electron density, *Phys. Rev. B* 37 (1988) 785.
- [49] G. Petersson, M.A. Al-Laham, A complete basis set model chemistry. II. Openshell systems and the total energies of the first-row atoms, *J. Chem. Phys.* 94 (1991) 6081-6090.
- [50] GAUSSIAN 03W-revision B.02 for Windows, Version 6, Gaussian Inc., Pittsburgh, PA, 1995-2003.
- [51] P.C. Mahalanobis, On tests and measures of group divergence, *J. Asiatic Soc. Bengal* 26 (1930) 541-588.