



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA TERCI FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DE
BENZOILTIOUREIAS (RTB02 e RTB62) SOBRE
*Trypanosoma cruzi***

Londrina
2019

BRUNA TERCI FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DE
BENZOILTIOUREIAS (RTB02 e RTB62) SOBRE
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador(a): Profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni

Londrina
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

F363a Fernandes, Bruna Terzi.
Atividade antimicrobiana e imunomoduladora de Benzoiltioreias (RTB02 e RTB62) sobre *Trypanosoma cruzi* / Bruna Terzi Fernandes. - Londrina, 2019. 69 f. : il.

Orientador: Lucy Megumi Yamauchi Lioni.
Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2019.
Inclui bibliografia.

1. Doença de Chagas - Tese. 2. Benzoiltioreia - Tese. 3. Antimicrobiano - Tese. 4. Imunomodulação - Tese. I. Lioni, Lucy Megumi Yamauchi . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

CDU 579

BRUNA TERCÍ FERNANDES

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DE
BENZOILTIOUREIAS (RTB02 e RTB62) SOBRE
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientador(a): Profa. Dra. Lucy Megumi
Yamauchi Lioni
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof. Dr. Eliandro Reis Tavares
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 25 de março de 2019.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me proteger e guiar com sua luz, e me sustentar em todos momentos da minha vida e durante a realização desse trabalho.

A profa. Dra. Lucy Megumi Yamauchi Lioni pela oportunidade, orientação, paciência e ensinamentos durante esses dois anos. Muito Obrigada.

A profa. Dra. Sueli Fumie Yamada Ogatta por ter sido a primeira a me aceitar no laboratório e ter me indicado para a profa Lucy. Obrigada por toda ajuda e orientação durante o desenvolvimento desse trabalho.

Ao prof. Dr Eliandro Reis Tavares e Jucevânia Pereira dos Santos pela colaboração e ajuda com os experimentos.

A profa. Dra. Marcelle de Lima Ferreira Bispo pelo fornecimento das substâncias utilizadas nos experimentos.

Aos amigos e colegas do laboratório, que me ajudaram desde o início e me ensinaram muita coisa, em especial as meninas Gabriella Maria Andriani e Lillian Martins Cruz que se tornaram mais que amigas de laboratório. A Patrícia Pereira Moraes Lopes por ter contribuído e auxiliado nos experimentos. A Ana Elisa Belotto Morguette, Guilherme Bartolomeu Gonçalves, Ayrton Pappi Netto, Daniela Adelia Fernandes e Caroline Lucio Moreira por todos os momentos compartilhados, ajuda, companheirismo e amizade.

Ao Laboratório de Imunopatologia Experimental, Prof. Dr Phileno Pinge-Filho e principalmente as meninas Maria Isabel Lovo Martins, Helena Tiemi Suzukawa e Aparecida Donizette Malvezi pela troca de conhecimento e por me socorrerem com os *T. cruzi*.

A Milena Menegazzo Miranda, João Paulo Assolini e Fernanda Tomiotto Pellissier do laboratório de imunoparasitologia por todo o auxílio.

Aos camundongos que fizeram seu papel na terra e com suas vidas me permitiram finalizar esse trabalho.

A minha Família por serem a base da minha dedicação e motivação. Minha mãe Claudia, irmã Beatriz, tia Andrea, Fernando e Ana Luiza. Amo Muito vocês!

Ao meu noivo, meu maior incentivador e companheiro. Obrigada por toda a paciência, pelos abraços nos momentos difíceis e por não me deixar desistir desse sonho. Eu Te Amo!

A CAPES pelo financiamento da bolsa de mestrado.

Aos membros da banca por toda contribuição para melhoria desse trabalho.

E gratidão a todos que contribuíram para a realização e finalização deste estudo.

Muito Obrigada!

FERNANDES, Bruna Terceira. **Atividade Antimicrobiana e Imunomoduladora de Benzoiltioureias (RTB02 e RTB62) sobre *Trypanosoma cruzi***. 2019. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2019.

RESUMO

A doença de Chagas é considerada uma das principais doenças negligenciadas do mundo todo, pois afeta principalmente populações em regiões com maior fragilidade social e econômica. Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas atualmente por *Trypanosoma cruzi*, parasito causador da doença. O tratamento é limitado a apenas dois fármacos, que causam muitos efeitos colaterais e possuem baixa eficácia, portanto, estudos que buscam novos compostos terapêuticos são necessários para o desenvolvimento de fármacos realmente eficazes para o tratamento da doença. Derivados de tioureia têm se mostrado promissores agentes antimicrobianos, suas atividades já foram relatadas como antibacterianas e antifúngicas, mas há poucos estudos como agentes antiprotzoários. Por esse motivo, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana de duas benzoiltioureias sobre as três formas evolutivas de *T. cruzi*, seu mecanismo de ação e avaliação da citotoxicidade em células mamíferas, além da determinação e quantificação de Óxido Nítrico, Espécies Reativas de Oxigênio e avaliação na expressão de genes envolvidos na imunomodulação. Os ensaios mostraram que as duas substâncias inibiram o crescimento das formas flageladas e a proliferação das formas intracelulares de *T. cruzi*. Ambas induziram a produção de EROs, peroxidação lipídica e alteração no potencial de membrana que possivelmente levou a morte celular do parasito. Não ocorreu aumento no número de corpos lipídicos para RTB02, no entanto, quando epimastigotas foram tratados com RTB62 ocorreu declínio na produção. O efeito tripanocida não resultou da produção de EROs e NO por células aderentes do exsudato peritoneal e sim pela ação direta no parasito.

Palavras-Chave: doença de chagas; benzoiltiureia; antimicrobiano; imunomodulação.

FERNANDES, Bruna Terci. **Antimicrobial and Immunomodulatory Activity of Benzoylthioureas (RTB02 and RTB62) in *Trypanosoma cruzi***. 2019. Dissertation (Master 's Degree in Microbiology) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2019.

ABSTRACT

Chagas disease is considered to be one of the most important neglected diseases in the world, as it affects mainly populations in regions with greater social and economic fragility. It is estimated that 6 to 7 million people are currently infected with *Trypanosoma cruzi*, the parasite that causes the disease. The treatment is limited to only two drugs, which cause many side effects and have low efficacy, therefore, studies that look for new therapeutic compounds are necessary for the development of really effective drugs for the treatment of the disease. Thiourea derivatives have been shown to be promising antimicrobial agents, their activities have already been reported as antibacterial and antifungal, but there are few studies as antiprotozoal agents. For this reason, the present study aimed to evaluate the antimicrobial activity of two benzoyl thioureas on the three evolutionary forms of *T. cruzi*, its mechanism of action and evaluation of cytotoxicity in mammalian cells, besides the determination and quantification of Nitric Oxide, Reactive Species of Oxygen and evaluation in the expression of genes involved in immunomodulation. The assays showed that the two substances inhibited the growth of flagellated forms and the proliferation of the intracellular forms of *T. cruzi*. Both induced the production of EROs, lipid peroxidation and alteration in the membrane potential that possibly led to the parasite's cell death. There was no increase in the number of lipid bodies for RTB02, however, when epimastigotes were treated with RTB62 production declined. The trypanocidal effect did not result from the production of ROS and NO by adherent cells of peritoneal exudate, but by direct action on the parasite.

Key words: chagas disease; benzoylthioureas; antimicrobial; immunomodulation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 – Estrutura química da tioureia21

ARTIGO

FIGURA 1 – Estrutura química das Benzoiltioureias RTB02 e RTB62.....37

FIGURA 2 – Benzoiltioureias RTB02 e RTB62 inibem o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*.59

FIGURA 3 – Curva de crescimento de epimastigotas tratados com RTB02 e RTB62.....60

FIGURA 4 – Benzoiltioureias RTB02 e RTB62 inibem a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*.61

FIGURA 5 – Benzoiltioureias RTB02 e RTB62 inibem a proliferação das formas amastigotas de *T. cruzi*.62

FIGURA 6 – Alterações ultraestruturais em formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com as Benzoiltioureias63

FIGURA 7 – Mecanismo de ação das benzoiltioureias RTB02 e RTB62 sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.....64

FIGURA 8 – Mecanismo de ação das benzoiltioureias RTB02 e RTB62 sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.....65

FIGURA 9 – Benzoiltioureia RTB02 alteram o ciclo celular na fase G0/G1 das formas epimastigotas de *T. cruzi*.66

FIGURA 10 – Benzoiltioureias RTB02 e RTB62 não aumentam a produção de EROs nem de NO em células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi*.67

FIGURA 11 – Benzoiltioureia RTB02 diminui os níveis de expressão gênica de TGF- β , TNF- α e IL-10 e HO-1 e Ferritina e RTB62 aumenta a expressão de TGF- β e diminui HO-1 em células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi*.....68

LISTA DE TABELA

TABELA 1 – Sequência de iniciadores usados no PCR em tempo real	45
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µM	Micromolar
BZ	Benzonidazol
CIM	Concentração inibitória mínima
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção enzimática
eNOS	Óxido Nítrico sintase endotelial
EROs	Espécies reativas de oxigênio
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HO	Ânion hidroxila
IFN-γ	Interferon-gama
IL-4	Interleucina-4
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
iNOS	Óxido Nítrico sintase induzível
LPS	Lipopolissacarídeos
mg	miligramas
mL	mililitro
NF-KB	Fator de transcrição nuclear kappa B
NFX	Nifurtimox
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico sintase
NO ₂	Dióxido de nitrogênio
nNOS	Óxido Nítrico sintase neuronal
O ₂	Ânion superóxido
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SOD	Enzima superóxido dismutase
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta
TH1	Linfócito T auxiliar produtor de citocinas do padrão 1
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TLRs	Receptores do tipo Toll

SUMÁRIO

1	REVISÃO DE LITERATURA	10
1.1	DOENÇA DE CHAGAS.....	10
1.2	TRANSMISSÃO	11
1.3	CICLO DE VIDA E BIOLOGIA DO PARASITO	13
1.4	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	15
1.5	PATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO.....	16
1.6	DIAGNÓSTICO	18
1.7	TRATAMENTO	19
1.8	TIOUREIA E SEUS DERIVADOS	21
2	OBJETIVO	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26
	ANEXO - ARTIGO	34
	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DE BENZOILTIOUREIAS SOBRE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	
1	INTRODUÇÃO	35
2	MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1	SUBSTÂNCIAS SINTÉTICAS: BENZOILTIOUREIAS	37
2.2	FORMAS EVOLUTIVAS DE <i>T. CRUZI</i>	37
2.2.1	Forma Epimastigota	37
2.2.2	Formas Tripomastigotas e Amastigotas	38
2.3	CÉLULAS ADERENTES DO EXSUDATO PERITONEAL	38
2.4	ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE	38
2.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DAS BENZOILTIOUREIAS <i>IN VITRO</i> SOBRE AS FORMAS EVOLUTIVAS DE <i>T. CRUZI</i>	39
2.5.1	Efeito no Crescimento de Epimastigota.....	39
2.5.2	Efeito na Viabilidade de Tripomastigota	39

2.5.3	Efeito na Proliferação de Amastigotas Intracelulares	39
2.5.4	Mecanismos de Ação das Benzoiltioureas sobre as formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	40
2.5.4.1	Avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais de epimastigotas	40
2.5.4.1	Efeito na produção de espécies reativas de oxigênio total (EROs) em epimastigotas	41
2.5.4.2	Efeito na formação de corpos lipídicos em epimastigotas.....	41
2.5.4.3	Avaliação da peroxidação lipídica em epimastigotas	41
2.5.4.4	Determinação da integridade da membrana celular em epimastigotas	42
2.5.4.5	Avaliação do potencial de membrana mitocondrial de epimastigotas	42
2.5.4.6	Verificação do volume celular de epimastigotas.....	42
2.5.4.7	Avaliação do ciclo celular de epimastigotas	43
2.6	ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DAS BENZOILTIOUREIAS <i>IN VITRO</i> SOBRE CÉLULAS ADERENTES DO EXSUDATO PERITONEAL INFECTADOS POR <i>T. CRUZI</i>	43
2.6.1	Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico (NO).....	43
2.6.2	Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	43
2.6.3	Avaliação da Expressão Relativa de genes de macrófagos Infectados por <i>T. cruzi</i>	44
2.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	45
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÃO	54
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Doença de Chagas

Segundo a Organização Mundial da Saúde, as doenças tropicais negligenciadas consistem em um grupo de 17 doenças infecciosas ou parasitárias que são endêmicas em países tropicais e subtropicais. Essas doenças, afetam mais de 1 bilhão de pessoas no mundo todo, principalmente, mas não exclusivamente, populações desfavorecidas, que moram em áreas rurais ou urbanas com péssimas condições sanitárias e moradias precárias, que favorecem o frequente contato com vetores transmissores de doenças (WHO, 2017). Dentro desse grupo se enquadra a doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, considerada uma das principais doenças negligenciadas no mundo todo.

Acredita-se que a doença de Chagas tenha surgido há milhões de anos atrás como uma infecção exclusiva de animais silvestres e só começou a ser transmitida aos seres humanos por volta de 9.000 anos, quando se iniciaram as primeiras invasões do homem nos ambientes selvagens, segundo evidências de infecção humana encontradas em múmias na América do Sul (AUFDERHEIDE et al., 2004). Contudo, a doença estabeleceu-se como uma zoonose somente nos últimos 200 a 300 anos, devido ao desmatamento de áreas florestais para atividades agrícolas e pecuárias, que resultaram na adaptação dos animais selvagens e vetores transmissores a ambientes domésticos (COURA; DIAS, 2009).

O agente causador da doença, o vetor e as manifestações clínicas foram descobertas apenas em 1909, pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro Chagas na cidade de Minas Gerais (STEVERDING, 2014). Atualmente cerca de 8 milhões de pessoas estão infectadas por *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) protozoário causador da doença, principalmente populações residentes da América Latina, em que 21 países são endêmicos para a doença de Chagas (WHO, 2018).

Os países que possuem as maiores taxas de pessoas infectadas são: a Argentina com 1.505.235, Brasil (1.156.821), México (876.458) e Bolívia (607.186), sendo esse último, o país com a maior prevalência de infectados, com 6,1% casos a cada 100 habitantes, seguido da Argentina com 3,6%, Paraguai 2,1%, Equador 1,4% e Guatemala com 1,2% (WHO, 2015).

No Brasil, de 2,9 a 7,2 milhões de pessoas estão infectadas por *T. cruzi*, causando um total de 6.000 mortes por ano em decorrência da doença (MARTINS-MELO et al., 2014).

Nos últimos 25 anos, houve uma redução nos casos de transmissão da doença de Chagas por via vetorial, principalmente infecções causadas por *Triatoma infestans*, devido a eficientes políticas públicas de saúde no controle de populações de triatomíneos na América Latina e no Brasil, melhores condições habitacionais e avanços tecnológicos no monitoramento pelas vigilâncias epidemiológicas. Os casos de infecção vetorial, que ainda são notificados, são restritos a áreas com condições precárias e habitações ainda inadequadas (COURA; JUNQUEIRA, 2015; BARBOSA, 2006). No entanto, as infecções orais persistem, principalmente na região Amazônica. De acordo com dados do Ministério da Saúde, de 2007 a 2017 foram registradas 2.329 notificações de casos confirmados de doença de Chagas aguda no Brasil. A região norte obteve 95% dos casos confirmados, nordeste 2,85%, sul (0,17%) centro-oeste (1,36%) e sudeste (0,29%) (BRASIL, 2018).

Nas últimas décadas, a doença tem se espalhado para áreas não endêmicas, devido a maior facilidade de migração de indivíduos infectados assintomáticos de países da América Latina para os Estados Unidos, Austrália, Canadá e Espanha. Estima-se que nos Estados Unidos 300 mil pessoas encontram-se infectadas por *T. cruzi*, sendo a maioria imigrantes de países endêmicos (BERN; MONTGOMERY, 2009), enquanto que na Espanha são cerca de 6.000, no Canadá 1.200 e na Austrália 1.000. Agravado a migração de indivíduos infectados, os critérios de seleção para doações de sangue nesses países são pouco eficientes, contribuindo assim para a disseminação da doença (SCHMUNIS, 2007).

1.2 Transmissão

Existem diferentes formas de transmissão da doença, sendo a via vetorial a mais clássica, porém não a mais predominante atualmente. Nessa via de transmissão, o inseto vetor responsável pela infecção pertence à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae e são popularmente conhecidos como “barbeiro”. Existe cerca de 140 espécies de triatomíneos conhecidas, mas nem todas apresentam importância epidemiológica, as principais espécies transmissoras são: *Triatoma*

infestans, *T. dimidiata*, *T. brasiliensis*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (COSTA; PETERSON, 2012).

O protozoário hemoflagelado *T. cruzi*, pertence a Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae e Gênero *Trypanosoma*, é parasito obrigatório, uniflagelado e heteroxênico, dispõem de diferentes estágios morfológicos ao longo do seu ciclo de vida e capacidade de parasitar hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos) (BERMUDEZ et al., 2015; CÂMARA et al., 2016). No ambiente selvagem, mais de 100 espécies de mamíferos estão sujeitas a infecção, como, morcegos, tatus, marsupiais, coelhos, roedores e primatas, enquanto que, no ambiente doméstico, os principais alvos são os mamíferos residentes de habitações humanas, como, cachorros, gatos, roedores domésticos e seres humanos (COURA, 2015).

Recentemente a transmissão por via oral vem ganhando destaque. Ocorre através da ingestão de bebidas e alimentos contaminados com as formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*. Essa contaminação ocorre por meio da defecação dos triatomíneos infectados por *T. cruzi*, ou do próprio inseto triturado durante o preparo do alimento ou bebida. Quando consumidos, os parasitos atingem o trato gastrointestinal, rompem a mucosa gástrica por meio de moléculas de superfície, como a glicoproteína gp82, que são resistentes ao processo de proteólise do suco gástrico e se ligam as mucinas gástricas atingindo e infectando às células epiteliais (BARBOSA, 2006; YOSHIDA, 2008). No ambiente silvestre, esse tipo de transmissão é o mais frequente entre os animais (DIAS et al., 2008; DARIO et al., 2016).

No Brasil, alimentos como cana-de-açúcar e açaí são os principais responsáveis pelos surtos regionais; já na Venezuela e Colômbia são os sucos de frutas regionais como, laranja, tangerina e goiaba (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012). Entre 1995 a 2005, nos estados do Amapá, Maranhão e Pará, dos 233 casos confirmados para a doença de Chagas, 78% foram causados por transmissão via oral (DIAS, 2006). No período de 2005 a 2013 foram contabilizados 112 surtos da doença em 35 municípios da região Amazônica, sendo, 85 casos registrados no estado do Pará, 14 no Amapá, 5 no Amazonas, 2 em Tocantins e 2 casos na Bahia, todos causados por ingestão de açaí, caldo de cana e palmito de Babaçu *in natura* contaminados por *T. cruzi* (BRASIL, 2015).

A transmissão sanguínea por via transfusional era uma das principais vias de disseminação da doença em países endêmicos na década de 80 e 90. Entretanto, devido a exigência de triagem clínica e sorológica para doação de sangue, menor número de pacientes chagásicos nos bancos de sangue, e a menor faixa etária de doadores, houve uma redução na disseminação da doença por essa via. Atualmente, novos casos de transmissão sanguínea da doença de Chagas são raros, mas quando ocorrem, devem-se à falhas na identificação da doença pelos hemocentros e bancos de sangue, e/ou baixa sensibilidade dos exames sorológicos (MORAES-SOUZA; FERREIRA-SILVA, 2011).

Outras vias como transmissões congênitas, transplante de órgãos, acidentes de laboratório e pelo leite materno podem ocorrer, mas são raros quando comparados a outras vias de transmissão (CARLIER et al., 2011; RASSI; REZENDE, 2012).

Em países não endêmicos, ocorrem infecções por vias não vetoriais, como, transmissões sanguíneas, congênitas e doações de órgãos. A doença de Chagas nesses países é pouco compreendida, tornando-se um problema de saúde pública por passarem despercebidos pelos médicos e técnicos de saúde. Por esse motivo, é necessário o desenvolvimento de eficientes programas de conscientização sobre a doença e melhores serviços de triagens sorológicas e clínicas nos bancos de sangue nesses países (GASCON et al., 2010).

1.3 Ciclo de Vida e Biologia do parasito

T. cruzi possui três diferentes formas evolutivas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. As formas epimastigotas são flageladas, extracelulares, replicativas e não infectantes, presentes no intestino médio do inseto vetor. Quando alcançam a porção final do intestino do vetor, se diferenciam para as formas tripomastigotas metacíclicas que são as formas infectantes não replicativa do parasito. Os tripomastigotas metacíclicos são eliminados nas fezes e urina do barbeiro no momento do repasto sanguíneo, e o hospedeiro vertebrado se infecta por meio de lesões na pele ou diretamente nas mucosas.

No hospedeiro, as formas tripomastigotas invadem tecidos e diferentes tipos de células da derme ou mucosas, e no citoplasma se diferenciam em amastigotas. Essa forma evolutiva possui um flagelo curto interiorizado, multiplicam-se intracelularmente por divisão binária, e após 5 dias diferenciam-se novamente em

tripomastigotas, sendo liberadas após causarem a ruptura das células hospedeiras, infectando as células adjacentes (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013). Após vários ciclos de infecção, replicação e ruptura das células, as formas tripomastigotas atingem a corrente sanguínea podendo alcançar outros tecidos e órgãos, ou ainda, serem ingeridos pelo inseto vetor no momento da hematofagia. No hospedeiro invertebrado, as formas tripomastigotas atingem o intestino, diferenciando-se em epimastigota, completando assim o seu ciclo de vida (TYLER; ENGMAN, 2001).

As três formas evolutivas de *T. cruzi* possuem algumas características distintas com relação a morfologia do parasito, disposição do flagelo, organização do núcleo e formato e posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. As formas epimastigotas são alongadas, possuem núcleo esférico e o flagelo emerge da bolsa flagelar que localiza-se na porção anterior do corpo celular que está próximo ao cinetoplasto em formato de bastão. Tripomastigotas possuem formato alongado e levemente achatado. O flagelo emerge lateralmente e se adere por todo o corpo, mas se torna livre para movimentação na extremidade posterior. Possui cinetoplasto arredondado que se localiza posteriormente ao núcleo central achatado. As formas amastigotas são arredondadas, possuem um flagelo curto interiorizado, um núcleo central grande e redondo; e cinetoplasto com formato de bastão, localizado entre o núcleo e flagelo (DE SOUZA, 2002; TEIXEIRA et al., 2012).

Apesar das formas possuírem individualidades morfológicas, existem algumas características similares e peculiares presentes em *T. cruzi*, assim como, em todos os membros da família Trypanosomatidae. Dispõem de uma única mitocôndria que se estende por todo o parasito, podendo ocupar até 12% do volume total da célula (DE SOUZA, 2002).

As mitocôndrias produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) em sua cadeia respiratória durante o processo de respiração celular. O estresse oxidativo gerado por essa produção causa danos as células e nas enzimas mitocondriais, podendo causar mutações no DNA mitocondrial e danos nas bicamadas lipídicas. Para evitar a deterioração celular, a própria célula de *T. cruzi* possui sistemas antioxidantes formados por enzimas, como a enzima superóxido dismutase (SOD) e moléculas que promovem a desintoxicação e eliminação desses radicais. No entanto, quando ocorre um intenso estresse oxidativo, há um desequilíbrio entre as espécies oxidantes e redutoras, provocando a oxidação de macromoléculas como DNA, lipídios

e proteínas podendo causar a morte do parasito (JO et al., 2001; DE SOUZA, 2008, KIRKINEZOS; MORAES, 2001).

T. cruzi apresenta também glicossomos, que são responsáveis por armazenar enzimas da via glicolítica, acidocalcissomas, que armazenam íons, como, sódio, cálcio, fósforo, magnésio, entre outros. Já os reservossomos armazenam lipídeos, proteínas e algumas proteases que participam da interação de *T. cruzi* à célula hospedeira, além de atuarem na nutrição e diferenciação dos parasitos. Outras características marcantes desses tripanosomatídeos, são a presença de um vacúolo contrátil com função de osmoregulação e de uma invaginação da membrana plasmática, chamada bolsa flagelar, de onde emerge o flagelo, além de atuar como sítio de endocitose e exocitose (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014; DE SOUZA, 2009).

1.4 Manifestações Clínicas

A doença de Chagas possui fase aguda e fase crônica de infecção. A fase aguda representa a infecção e disseminação de *T. cruzi* no hospedeiro vertebrado nos primeiros 8 dias após o contágio, com duração de quatro a oito semanas. Nessa fase verifica-se alta parasitemia, podendo o paciente apresentar febre de 38°C a 40°C, mal-estar, cefaleia, vômito, diarreia, anorexia e linfadenopatia. Na maioria dos casos, esses sintomas passam despercebidos por serem leves, inespecíficos e facilmente confundidos com doenças virais e em casos de transmissão congênita essa fase é assintomática dificultando ainda mais o diagnóstico (STEVERDING, 2014).

Durante a fase aguda, caso o paciente não seja tratado, instaura-se a fase crônica da doença, caracterizada por baixa parasitemia e na maioria dos casos os pacientes permanecem assintomáticos, representando a forma clínica indeterminada da doença. Cerca de 70% dos pacientes na fase crônica indeterminada continuarão assintomáticos por toda a vida, enquanto os 30% restantes, no decorrer de 20 a 30 anos, poderão desenvolver a fase crônica sintomática. Essa diferença na sintomatologia depende do estado imunológico do indivíduo infectado e a virulência da cepa de *T. cruzi* (SALVADOR et al., 2014; LEWIS; KELLY, 2016).

Pacientes portadores da doença crônica sintomática podem desenvolver distúrbios cardíacos, inflamatórios e fibrosantes, dentre eles, cardiomiopatia, insuficiência cardíaca, hipertrofia do coração, alterações vasculares com progressiva

destruição do miocárdio podendo muitas vezes levar o paciente a óbito por morte súbita ou insuficiência cardíaca. Distúrbios gastrointestinais afetam de 10 a 21% dos pacientes chagásicos crônicos, sendo mais frequentes na América do Sul e causam problemas como megaesôfago, desordens de motilidade, refluxo esofágico e megacólon (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017).

1.5 Patogênese e Resposta Imune do Hospedeiro

Todas as células nucleadas do hospedeiro vertebrado são susceptíveis a invasão por *T. cruzi*. Para isso, o parasito utiliza mecanismos de adesão presentes na superfície celular para se ancorarem na membrana celular do hospedeiro. Glicoproteínas, como, gp82 presente em tripomastigotas metacíclicos, transialidases em tripomastigotas sanguíneos e mucinas encontradas em ambas as formas, são algumas das moléculas que atuam no processo de adesão entre célula hospedeira e parasito para realizarem a invasão celular (BARRIAS; DE CARVALHO; DE SOUZA, 2013).

Na fase aguda a imunidade inata é ativada por meio do reconhecimento dos PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), como glicoproteínas de adesão e outras moléculas presentes na superfície celular do protozoário, por receptores do tipo Toll (TLRs) presentes em células NK, macrófagos e células dendríticas. Com o reconhecimento, há uma intensa produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que resultam na migração de fagócitos para o local infectado afim de controlar e eliminar o patógeno. No entanto, a reação inflamatória causada pode levar a dano e disfunção orgânica no tecido do hospedeiro (JUNQUEIRA et al., 2010).

Com a entrada dos parasitos nas células, ocorre uma fusão da membrana plasmática com os lisossomos, formando-se um vacúolo parasitóforo extremamente ácido e importante para o processo de diferenciação das formas tripomastigotas em amastigotas, além de promover a ativação e secreção da proteína Tc-Tox responsável pelo rompimento do vacúolo para a evasão do parasito no citoplasma da célula (ANDREWS et al., 1990; BERN, 2015).

A infecção por *T. cruzi* desencadeia diferentes reações imunológicas e intensa resposta inflamatória no hospedeiro vertebrado. Inicialmente o sistema imune inato reconhece e controla a invasão e multiplicação dos parasitos nas células, mediante

células *Natural Killer* (NK), células dendríticas e macrófagos. Além disso, atuam em conjunto, células e moléculas da imunidade adquirida, linfócitos TCD4+ e TCD8+, linfócitos B, citocinas, como, Interferon gama (IFN- γ) e Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), todos essenciais para a regulação e efetivação da resposta imune (GEIGER et al., 2016; POVEDA et al., 2014).

Estudos realizados em modelos murinos, demonstraram que para uma resposta imune eficiente no controle de *T. cruzi* durante a fase aguda, é necessária uma resposta do tipo T_H1 com produção de citocinas pró-inflamatórias, como: IFN- γ , TNF- α , Interleucinas (IL-12), e produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos, para o controle do crescimento e morte dos parasitos intracelulares. As citocinas IFN- γ e IL-12 também são responsáveis pela ativação e diferenciação de linfócitos T em efetores (TCD4+) e citotóxicos (TCD8+) que desempenham a função de ativação de linfócitos B para secreção de anticorpos para auxiliarem no controle das formas tripomastigotas extracelulares (PESTKA; KRAUSE; WALTER, 2004; PISSETTI et al., 2011). Contudo, quando ocorre a produção de citocinas do tipo T_H2 (IL-4, IL-10) e Fator de Transformação do Crescimento Beta (TGF- β) verifica-se uma inibição na atividade dos macrófagos com multiplicação exacerbada dos parasitos (SANTOS, 2016).

Devido as citocinas desempenharem papel primordial nas respostas imunes celulares e humorais, é essencial um equilíbrio entre citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias moduladoras, de forma a diminuir o número de parasitos, sem causar grandes danos teciduais. Pacientes chagásicos que desenvolvem a fase crônica assintomática apresentam um equilíbrio entre o crescimento e eliminação dos parasitos devido à alta produção de citocinas regulatórias, como IL-10 (DE ARAÚJO et al., 2012). Atuam também as citocinas IL-4 e TGF- β como agentes anti-inflamatórios, pois inibem a produção de NO (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014).

A predominância do processo inflamatório influencia na progressão da doença para a fase crônica sintomática. Estudos têm mostrado que a permanência da infecção e a resposta imune inflamatória do hospedeiro tem grande influência no desenvolvimento de cardiomiopatias, comprometimento digestório e danos teciduais nos órgãos acometidos pela infecção (MACHADO et al., 2012). Essas lesões são desencadeadas por infiltrados de células mononucleares, aumento da secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, principalmente TGF- α e IFN- γ nos tecidos e secreções de enzimas proteolíticas pelos parasitos (FERREIRA et al., 2014; MARINETO et al., 2007).

O óxido nítrico é um radical livre reativo que possui importante papel citotóxico nas respostas imunológicas, sendo a principal molécula responsável pela eliminação do parasito intracelular. É produzido principalmente por macrófagos, mas também por outros tipos de células do sistema imunológico, além de estarem envolvidos em outros processos biológicos e fisiológicos no hospedeiro vertebrado. Sua produção ocorre pela oxidação de nitrogênios da L-arginina convertida em L-citrulina pela ação de enzimas óxido nítrico sintase (NOS). Há três diferentes isoformas de NOS, devido a suas propriedades funcionais, organização nos tecidos e peso molecular, são elas: Óxido Nítrico sintase induzível (iNOS), óxido nítrico sintase neuronal (nNOS) e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (GUTIERREZ et al., 2009; DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Além do NO, espécies reativas de oxigênio (EROs) também são substâncias produzidas por células do sistema imune com ação antimicrobiana e de importância relevante no controle da infecção por *T. cruzi*. EROs são um grupo de moléculas denominadas, ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ânion hidroxila (HO) todas produzidas pelo metabolismo normal da célula. Porém, na presença de uma infecção, ocorre aumento em sua produção gerando desequilíbrio no balanço antioxidante-oxidante. Essa incapacidade de neutralização desencadeia um estresse oxidativo intracelular, podendo causar danos citotóxicos aos componentes celulares do hospedeiro ou danificar tecidos adjacentes (GUPTA et al., 2009; HALLIWELL, 2007).

1.6 Diagnóstico

O diagnóstico na fase aguda pode ser realizado por métodos parasitológicos diretos, como a visualização microscópica de formas tripomastigotas em esfregaços sanguíneos ou outros fluidos corporais, como o líquido cefalorraquidiano corados com Giemsa (sensibilidade de 34-85%). Pode ser realizada também a reação em cadeia da polimerase (PCR) do sangue periférico, uma vez que apresenta uma maior sensibilidade comparada a microscopia (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017).

Na fase crônica, em razão da baixa parasitemia, os diagnósticos são realizados por técnicas imunológicas, para detecção de anticorpos e antígenos relacionados ao parasito no soro do paciente. Testes de hemaglutinação indireta, ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) e imunofluorescência indireta são os testes que

apresentam maior sensibilidade e especificidade. Como não há uma única técnica padrão para o diagnóstico da doença de Chagas, são necessários, simultaneamente, o uso de no mínimo dois testes sorológicos com princípios metodológicos diferentes, para definição do resultado final. Técnicas de PCR para detecção do DNA do parasito em amostras sanguíneas podem ser úteis quando os resultados sorológicos se mantêm inconclusivos, no entanto, podem apresentar sensibilidade variáveis, 50% a 90% dependendo da fase de infecção, diversidade genética do parasito e volume sanguíneo (COSTA et al., 2013; MEIS; CASTRO, 2017).

No caso da fase crônica cardíaca, o diagnóstico deve ser realizado por eletrocardiogramas, ultrassonografias cardíacas e ressonância magnética cardíaca, já quando acomete o trato gastrointestinal é realizado uma radiografia de contraste do esôfago, endoscopia superior ou manometria esofágica (ANTINORI et al., 2017; RASSI; MARIN-NETO; RASSI, 2017).

1.7 Tratamento

O tratamento para a doença de Chagas se restringe a apenas dois fármacos, Benzonidazol e Nifurtimox, mas somente o BZ é comercializado no Brasil. São administrados por via oral e eficientes somente na fase aguda da doença, apresentando muitos efeitos colaterais aos pacientes.

O benzonidazol (*N*-benzil-2-nitroimidazol acetamida) foi desenvolvido em 1966 sendo o primeiro medicamento utilizado no tratamento da doença de Chagas, que é atualmente o mais utilizado devido a sua melhor eficácia. O tratamento tem duração de 60 dias e apresenta uma porcentagem de cura de apenas 76% em pacientes chagásicos agudos. Na fase crônica, o tratamento com esse medicamento apresenta melhor eficiência em crianças menores de 13 anos (60 a 93%), e uma baixa eficiência em adultos (2 a 40%). Causa muitos efeitos adversos, de 29 a 50% dos pacientes apresentam erupções cutâneas por hipersensibilidade, 40% distúrbios do sono, 5-15% intolerância digestiva, entre outras manifestações, como cefaléia, dores musculares e anorexia (CANÇADO, 1999; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2017), por esse motivo, cerca de 12 a 13% dos pacientes em terapia com benzonidazol interrompem o tratamento (SALES JUNIOR et al., 2017).

O mecanismo de ação do benzonidazol ocorre por meio da redução do seu grupo nitro NO₂ a grupo amino, pela enzima nitroreductase tipo I. Desse processo de

redução, são formados espécies reativas e moléculas citotóxicas que atuam na ligação e modificação covalente de macromoléculas do protozoário como o DNA nuclear e mitocondrial, lipídeos e proteínas (GASPAR et al., 2015).

O Nifurtimox [3-metil-4-(5-nitrofurfurilidenoamino) tetra-hidro-4*H*-tiazina-1,1-dióxido], comercializado desde 1970, também é utilizado no tratamento da doença de Chagas. No entanto, apresenta muitos efeitos colaterais, mesmo em baixas doses, como: perda de peso, náuseas, vômitos, distúrbios neurológicos, febre e erupções cutâneas (DIAS et al., 2016). Em pacientes na fase aguda, com tempo de infecção recente e crianças, a taxa de cura do nifurtimox pode chegar a 88%-100%, já na fase crônica assintomática a cura pode chegar a 85,7%. Para adultos a eficiência no tratamento é de apenas 7 a 8% (SALES JUNIOR et al., 2017).

O Nifurtimox também atua no mecanismo de redução do seu grupo nitro, que é reduzido a um radical ânion, seguido de auto-oxidação com produção de radicais ânion superóxidos e outros metabólitos de oxigênio, como o peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, que apresentam grande potencial citotóxico ao parasito (SOBRINHO et al., 2007).

Ambos os medicamentos não eliminam os parasitos, apenas diminuem a carga parasitária, e são indicados a todos os pacientes, até em casos de reativação da infecção ou co-infecção por HIV, por serem os únicos medicamentos comprovadamente eficazes contra *T. cruzi* (SARTORI et al., 2002).

Desde o ano de 1970 não é disponibilizado nenhum outro fármaco para o tratamento da doença de Chagas, e não existem vacinas eficientes até o momento (PINHEIRO et al., 2017). As despesas são altas com os tratamentos e prevenções da doença para os serviços de saúde de países endêmicos. No Brasil, o custo anual com assistência médica encontra-se na faixa de 49 a 253 milhões de dólares (LEE et al., 2013). Na Colômbia, estima-se que são gastos 267 milhões de dólares por ano com tratamentos médicos e controle vetorial (CASTILLO-RIQUELME et al., 2008). E os custos mundiais chegam a 7 bilhões de dólares ao ano (SANTOS, 2016).

No decorrer dos anos e no progresso dos estudos houve um avanço no conhecimento da biologia de *T. cruzi* e em suas características genéticas, biológicas e metabólicas, além de seus mecanismos de invasão celular e evasão do sistema imune. Esses conhecimentos sobre o parasito, a ineficiência nas quimioterapias atuais para o tratamento da doença de Chagas e o desinteresse das indústrias farmacêuticas na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos potencialmente eficazes,

favorecem a busca de novas moléculas e substâncias que possuam a capacidade de modificar estruturas, organelas e membranas celulares atuando na inibição da síntese de moléculas importantes para a sobrevivência do parasito, podendo assim, tornarem-se substâncias químicas promissoras para o tratamento da doença de Chagas.

1.8 Tioureia e seus Derivados

Diversas pesquisas têm demonstrado que a inserção e substituição de átomos em moléculas químicas apresentam-se como uma solução promissora para o desenvolvimento de novos compostos sintéticos com atividades biológicas. Essas modificações nos átomos de um determinado fármaco possibilitam alterações nas suas características físico-químicas, farmacodinâmicas e nas suas propriedades farmacocinéticas (FAIDALLAH; KHAN; ASIRI, 2011). Por exemplo, a introdução de átomos de cloro e flúor são capazes de aumentar a lipofilicidade e melhorar o transporte e as taxas de absorção *in vivo* de um composto químico (BIELENICA et al., 2016).

Tioureia é um composto formado por átomos de carbono, enxofre, nitrogênio e hidrogênio ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) semelhante a ureia, com exceção a presença de um átomo de enxofre no local do átomo de oxigênio (Figura 1). Devido a sua versatilidade química, as tioureias fazem parte de um importante grupo de substâncias com aplicação em diversas áreas da química, podendo ser utilizadas como organocatalisadores (CONNON, 2006), na fabricação de nanopartículas de sulfeto de cádmio semiconductor (MISHRA; BATRA, 2013), além de serem utilizadas em indústrias de corantes, borrachas e em indústrias farmacêuticas na produção de medicamentos (MERTSCHENK; KNOTT; BAUER, 2013).

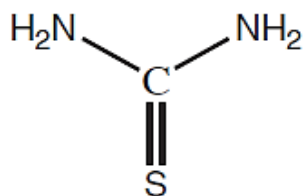


Figura 1. Estrutura química da tioureia (SAEED et al., 2013).

Tioureia e seus derivados são facilmente obtidos, existindo diversas técnicas

para sua síntese. Os métodos mais utilizados envolvem a reação de aminas primárias, em meio aquoso, com dissulfetos de carbono, utilizando acetato de mercúrio, e também, a condensação de aminas primárias e secundárias com isotiocianato e tiofosgeno (MADDANI; PRABHU, 2010).

Diversos pesquisadores já sintetizaram e caracterizaram diferentes derivações de tioureia por meio de alterações dos átomos, e demonstraram suas atividades antimicrobianas sobre diferentes microrganismos (SANNA et al., 2018; DRZEWIECKA-ANTONIK et al., 2017).

Keche e colaboradores (2012) demonstraram que a substituição de átomos e moléculas em posições específicas podem afetar positivamente a atividade biológica de um composto. Assim, sintetizaram o derivado 1-acetil-3,5-diaril-4,5-di-hidro (1H) - pirazol contendo uréia, tioureia e sulfonamida e submeteram esse composto à substituição de radicais por Flúor (F), trifluorometil (CF₃) ou trifluorometoxi (OCF₃) na posição orto e cloro (Cl) na posição para no anel benzeno da ureia ou na posição terminal da tioureia. Verificaram que essas alterações no derivado aumentaram a atividade antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas e gram-negativas e melhoraram as atividades anti-inflamatórias.

Um complexo estável formado por moléculas de tioureia, quitosana e prata foi preparado por Chen e colaboradores (2005) e testado em *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, *Mucor bacilliformis* e *Paecilomyces variotii*. Foi observado que o complexo apresentou atividade contra todas as espécies testadas. No entanto, a atividade antibacteriana foi mais eficiente quando comparado a ação antifúngica. Eweis et al. (2006) também demonstraram a atividade do complexo quitosana e tioureia sobre o crescimento *in vitro* de fungos patogênicos de plantações de beterrabas e observaram que os derivados de tioureia foram capazes de inibir o crescimento dos fungos na concentração de 5 a 1000 µg/ml, e que a junção das duas moléculas mostrou-se 60 vezes mais eficiente que a quitosana pura.

Em relação aos protozoários, Ibrahim et al. (2014) sintetizaram quatro derivados de carbonil tioureia e testaram sobre duas espécies de *Acanthamoeba*, causadores da queratite e encefalite amebiana granulomatosa. Os resultados indicaram que todos os derivados testados foram ativos contra as duas espécies, com IC₅₀ de 2,39 a 3,74 µg/mL, com efeitos citotóxicos apenas ao patógeno.

A cloroquina, é um fármaco utilizado no tratamento da malária, mas, nos últimos anos foram selecionadas cepas resistentes de *Plasmodium falciparum*, sendo assim, Sunduru et al. (2009) sintetizaram novos compostos derivados a partir da cloroquina. Foram incorporados na cadeia 1,4- diaminoalquila moléculas de tiourea, tiazolidinediona e ácido tiocarbônico. Os derivados formados pela combinação tiourea-cloroquina obtiveram bons resultados de inibição sobre cepas sensíveis e resistentes de *P. falciparum*, com IC₅₀ de 6,07 a 42,02 µg/mL e não apresentaram citotoxicidade contra células VERO. O tratamento sobre cepas resistentes de *Plasmodium yoelii* em modelos de infecção *in vivo*, também se mostrou mais ativa comparado ao medicamento padrão, com 99,27% de inibição após 4 dias de tratamento.

Jin et al. (2009) utilizando macrófagos estimulados por lipopolissacarídeos (LPS) observaram que a fenilisotiourea, na concentração de 50 µM, foi capaz de inibir 96% da produção de NO comparado ao grupo controle. O derivado atuou na inibição da fosforilação do NF-KB, impedindo a expressão de iNOS e consequentemente inibindo a produção de NO, demonstrando que derivados de tiourea apresentam grande potencial também para o desenvolvimento de compostos terapêuticos para doenças associadas a excessiva produção de NO.

Quanto as atividades anti-tripanosomatídios dos derivados de tiourea, pesquisas realizadas em *Trypanosoma brucei*, causador da Tripanosomíase Africana (Doença do Sono), relataram a descoberta do derivado N-(4-sulfamoilfenil) tiourea como uma nova classe de inibidores da Leucil-tRNA sintetase do parasito. A enzima Leucil-tRNA sintetase é um tipo de aminoacil que auxilia no processo de ligação dos aminoácidos codificados pelo código genético ao seu RNA transportador (tRNA). Além de atuar na hidrólise dos tRNA que se ligam a aminoácidos incorretos. No estudo, quando os protozoários foram submetidos ao tratamento com N-(4-sulfamoilfenil) tiourea ocorreu a inibição da enzima Leucil-tRNA; consequentemente houve a interrupção da síntese proteica e a morte dos parasitos tratados (ZHANG et al., 2013).

Du et al. (2000), sintetizaram e testaram diferentes compostos de tiourea sobre as enzimas cisteínas proteases de *Trypanosoma cruzi* (cruzipaína) e *Trypanosoma brucei* (rodesaína). Essas enzimas são essenciais para crescimento, diferenciação e sobrevivência dos parasitos no hospedeiro vertebrado e têm como função a degradação de proteínas e acredita-se que estejam relacionadas com a evasão do parasito ao sistema imune. Sendo assim, os resultados do estudo mostraram que dois

dos compostos testados que possuíam moléculas de ureia e tioureia apresentaram atividades de inibição contra as duas cisteínas proteases *in vitro* e inibição *in vivo* sobre *T. cruzi*.

Derivados de tioureia também foram testados quanto a suas atividades leishmanicidas sobre a espécie *Leishmania amazonensis*. Uma série de 26 derivados de tioureias N,N'-dissubstituídas foram sintetizados por dois diferentes métodos de reação e analisados seus efeitos sobre o parasito e os potenciais citotóxicos em células mamíferas. Os resultados mostraram que nove derivados apresentaram atividade inibitória sobre as formas promastigotas, com valores de IC₅₀ menores de 200 µM e baixa citotoxicidade (>200 µM). Quando testadas sobre as formas intracelulares, cinco dos derivados apresentaram inibição, com IC₅₀ variando de 70 a 150 µM (VIANA et al., 2017).

Outra classe de derivados de tioureia que têm apresentado eficientes atividades biológicas e bons efeitos antimicrobianos são as benzoiltioureias. O nome deve-se a presença do composto aromático ácido benzoico na formulação química desse composto derivado (SAEED et al., 2014). Essas moléculas já demonstraram ação antimicrobiana e inibição da formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa* (LIMBAN; MARUTESCU; CHIFIRIUC, 2011). Uma série de 4-(3-benzoiltioureido) benzoatos de etila foram sintetizadas e apresentaram ser potentes inibidores da enzima urease de *Canavalia ensiformis* (SAEED et al., 2014). Rauf et al. (2013) também demonstraram a capacidade de N,N'-dissubstituídas derivadas de ácido benzoico na inibição de ureases, enquanto outros estudos relataram ação de N-fenil-N'-benzoiltioureia sobre células cancerígenas (PARVEEN et al., 2019).

Brito e colaboradores (2017) sintetizaram 55 tipos de benzoiltioureias N-substituídas e avaliaram a atividade antimicrobiana contra *Mycobacterium tuberculosis*. Do total de substâncias testadas, 19 derivados obtiveram resultados relevantes sobre as bactérias causadoras da tuberculose, com concentração inibitória mínima (CIM) variando de 9,6 a 423,1 µM. No entanto, um dos compostos se destacou, com CIM de 9,6 µM, apresentando-se mais potente que o fármaco utilizado no tratamento da tuberculose.

Os resultados de todos esses estudos demonstram que os derivados de tioureia são bons candidatos para o desenvolvimento de novas pesquisas que visam descobrir novas substâncias para o tratamento da doença de Chagas.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de benzoiltioureias sobre *Trypanosoma cruzi* e sua ação imunomoduladora sobre células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Verificar se as benzoiltioureias apresentam potencial citotóxico sobre células aderentes do exsudato peritoneal;
- Verificar se as benzoiltioureias possuem atividade antimicrobiana *in vitro* sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*;
- Investigar o mecanismo de ação *in vitro* das benzoiltioureias sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*;
- Identificar as alterações morfológicas e ultraestruturais das benzoiltioureias sobre a forma epimastigota de *T. cruzi*.
- Determinar se as benzoiltioureias influenciam nos níveis de óxido nítrico e na produção de espécies reativas de oxigênio em células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi*;
- Analisar a expressão de genes de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, moléculas envolvidas no metabolismo de ferro, defesas antioxidantes e moduladoras da resposta imune em células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi* e tratados com benzoiltioureias.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L.; GRIFFITHS, G. A. *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, 1990.

ANTINORI, S.; GALIMBERTI, L.; BIANCO, R.; GRANDE, R.; GALLI, M.; CORBELLINO, M. Chagas disease in Europe: A review for the internist in the globalized world. **European Journal of Internal Medicine**, v. 43, p. 6-15, 2017.

AUFDERHEIDE, A. C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ALLISON, M. A 9,000-year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 7, p. 2034–2039, 2004.

BARBOSA, P. R. B. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International journal of cardiology**, v. 112, n. 1, p. 132-133, 2006.

BARRIAS, E. S.; DE CARVALHO, T. M. U.; DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: Entry into mammalian host cells and parasitophorous vacuole formation. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1–10, 2013.

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C.; SIMONAZZI, A.; REAL, J. P.; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1–16, 2015.

BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 52-54, 2009.

BIELENICA, A.; STEFANSKA, J.; KOZIOL, A. E.; IULIANO, F.; COLLU, D.; SANNA, G.; JOZWIAK, M.; STRUGA, M. Thiourea derivatives of 4-azatricyclo[5.2.2.0^{2,6}]undec-8-ene-3,5-dione - Synthesis and biological activity. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 73, n. 3, p. 693-703, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. **Doença de Chagas aguda - casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação**. Brasília, DF, 2018. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/chagasbr.def>>

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim epidemiológico: Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013**. Brasília, DF, 2015.

BRITO, T. O. **Benzoiltioureias: Síntese, atividades antimicobacteriana, antiureolítica e estudo de interação com uréase por RMN**. 2017. 284f. Tese (Doutorado em Química, Programa de Pós-Graduação em Química Associado, UEL-UEPG-UNICENTRO) – Universidade estadual de Londrina, Londrina, 2017.

CÂMARA, C. C.; DA SILVA, R. T.; CARVALHO, S. A.; SILVA, E. F.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Complexos de platina e rutênio candidatos ao tratamento da doença de Chagas. **Almanaque Multidisciplinar de Pesquisa**, v. 1, n. 2, p. 51–67, 2016.

CANÇADO, J. R. Criteria of Chagas disease cure. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 331–335, 1999.

CARLIER, Y.; TORRICO, F.; SOSA-ESTANI, S.; RUSSOMANDO, G.; LUQUETTI, A.; FREILIJ, H.; VINAS, P. A congenital Chagas disease: recommendations for diagnosis, treatment and control of newborns, siblings and pregnant women. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 10, p. 1250, 2011.

CASTILLO-RIQUELME, M.; GUHL, F.; TURRIAGO, B.; PINTO, N.; ROSAS, F.; MARTÍNEZ, M. F.; CAMPBELL-LENDRUM, D. The costs of preventing and treating Chagas disease in Colombia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, 2008.

CHEN, S.; WU, G.; ZENG, H. Preparation of high antimicrobial activity thiourea chitosan-Ag⁺ complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 1, p. 33–38, 2005.

CONNON, S. J. Organocatalysis mediated by (thio)urea derivatives. **Chemistry–A European Journal**, v. 12, n. 21, p. 5418-5427, 2006.

COSTA, M.; TAVARES, V.; AQUINO, M. V.; MOREIRA, D. Doença de Chagas: Uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica da Faculdade de Ceres**, v. 2, n. 1, 2013.

COSTA, J.; PETERSON, A. Ecological niche modeling as a tool for understanding distributions and interactions of vectors, hosts, and etiologic agents of Chagas disease. In: **Recent advances on model hosts**. New York: Springer, 2012. p. 59-70.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 31-40, 2009.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions-A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

COURA, J. R.; JUNQUEIRA, A. C.V. Surveillance, health promotion and control of Chagas disease in the Amazon Region-Medical attention in the Brazilian Amazon Region: a proposal. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 7, p. 825-830, 2015.

DARIO, M. A.; RODRIGUES, M. S.; BARROS, J. H. D. S.; XAVIER, S. C. D. C.; D'ANDREA, P. S.; ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Ecological scenario and

Trypanosoma cruzi DTU characterization of a fatal acute Chagas disease case transmitted orally (Espírito Santo state , Brazil). **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–14, 2016.

DE ARAÚJO, F. F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROCHA, M. O. D. C.; CHAVES, A. T.; FIUZA, J. A.; FARES, R. C. G.; TEIXEIRA-CARVALHO, A. Foxp3+ CD25high CD4+ regulatory T cells from indeterminate patients with Chagas disease can suppress the effector cells and cytokines and reveal altered correlations with disease severity. **Immunobiology**, v. 217, n. 8, p. 768-777, 2012.

DE SOUZA, G. G. **Estresse oxidativo e citotoxicidade induzidos por ibuprofeno em *Trypanosoma cruzi***. 2008. 60f. Dissertação (Mestrado em Biologia Funcional e Molecular) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitology research**, v. 88, n. 12, p. 1013-1025, 2002.

DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 89-100, 2009.

DIAS, J. C. P. The treatment of Chagas disease (South American Trypanosomiasis). **Annals of Internal Medicine**, v. 144, n. 10, p. 772–774, 2006.

DIAS, J. P.; BASTOS, C.; ARAÚJO, E.; MASCARENHAS, A. V.; MARTINS NETTO, E.; GRASSI, F.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296-300, 2008.

DIAS, J. C. P.; CLÁUDIO, L. D. G.; LIMA, M. M.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; SILVA, R. A.; ALVES, R. V.; COSTA, V. M. D. Changes in the paradigm of clinical and therapeutic management of Chagas' disease: progress and perspectives in the pursuit of comprehensive health. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 21, p. 87–90, 2016.

DRZEWIECKA-ANTONIK, A.; REJMAK, P.; KLEPKA, M. T.; WOLSKA, A.; PIETRZYK, P.; STEPIEŃ, K.; STRUGA, M. Synthesis, structural studies and biological activity of novel Cu (II) complexes with thiourea derivatives of 4-azatricyclo [5.2. 1.02, 6] dec-8-ene-3, 5-dione. **Journal of inorganic biochemistry**, v. 176, p. 8-16, 2017.

DU, X.; HANSELL, E.; ENGEL, J. C.; CAFFREY, C. R.; COHEN, F. E.; MCKERROW, J. H. Aryl ureas represent a new class of anti-trypanosomal agents. **Chemistry & biology**, v. 7, n. 9, p. 733-742, 2000.

DUSSE, L. M. S. A.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. D. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 435-50, 2003.

EWEIS, M.; ELKHOLY, S. S.; ELSABEE, M. Z. Antifungal efficacy of chitosan and its thiourea derivatives upon the growth of some sugar-beet pathogens. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 38, n. 1, p. 1–8, 2006.

FAIDALLAH, H. M.; KHAN, K. A.; ASIRI, A. M. Synthesis and biological evaluation of new 3- trifluoromethylpyrazolesulfonyl-urea and thiourea derivatives as antidiabetic and antimicrobial agents. **Journal of Fluorine Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 131–137, 2011.

FERREIRA, L. R. P.; FRADE, A. F.; BARON, M. A.; NAVARRO, I. C.; KALIL, J.; CHEVILLARD, C.; CUNHA-NETO, E. Interferon- γ and other inflammatory mediators in cardiomyocyte signaling during Chagas disease cardiomyopathy. **World journal of cardiology**, v. 6, n. 8, p. 782–90, 2014.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta tropica**, v. 115, n. 1-2, p. 22-27, 2010.

GASPAR, L.; MORAES, C. B.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; FERRARI, S.; COSTANTINO, L.; COSTI, M. P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Current and future chemotherapy for Chagas disease. **Current medicinal chemistry**, v. 22, n. 37, p. 4293-4312, 2015.

GEIGER, A.; BOSSARD, G.; SERENO, D.; PISSARRA, J.; LEMESRE, J. L.; VINCENDEAU, P.; HOLZMULLER, P. Escaping deleterious immune response in their hosts: Lessons from trypanosomatids. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–21, 2016.

GUPTA, S.; BHATIA, V.; WEN, J. J.; WU, Y.; HUANG, M. H.; GARG, N. J. *Trypanosoma cruzi* infection disturbs mitochondrial membrane potential and ROS production rate in cardiomyocytes. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 10, p. 1414-1421, 2009.

GUTIERREZ, F. R.; MINEO, T. W.; PAVANELLI, W. R.; GUEDES, P. M.; SILVA, J. S. The effects of nitric oxide on the immune system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p. 236-245, 2009.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, p. 1147-1150, 2007.

IBRAHIM, M. A.; YUSOF, M. S. M.; AMIN, N. M. Anti-amoebic properties of carbonyl thiourea derivatives. **Molecules**, v. 19, n. 4, p. 5191–5204, 2014.

JIN, G. H.; CHEON, Y. J.; GIM, H. J.; KIM, D. H.; KIM, H. D.; RYU, J. H.; JEON, R. Synthesis of phenylisothiourea derivatives as inhibitors of NO production in LPS activated macrophages. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 11, p. 3088–3092, 2009.

JO, S. H.; SON, M. K.; KOH, H. J.; LEE, S. M.; SONG, I. H.; KIM, Y. O.; SONG, B. J. Control of mitochondrial redox balance and cellular defense against oxidative damage by mitochondrial NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase (IDPm). **Journal of**

Biological chemistry, 2001.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12, 2010.

KECHE, A. P.; HATNAPURE, G. D.; TALE, R. H.; RODGE, A. H.; KAMBLE, V. M. Synthesis, anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of novel 1-acetyl-3,5-diaryl-4,5-dihydro (1H) pyrazole derivatives bearing urea, thiourea and sulfonamide moieties. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 21, p. 6611–6615, 2012.

KIRKINEZOS, I. G.; MORAES, C. T. Reactive oxygen species and mitochondrial diseases. **Seminars in cell and developmental biology**. Academic Press, v. 12, p. 449-457, 2001.

LEE, B. Y.; BACON, K. M.; BOTTAZZI, M. E.; HOTEZ, P. J. Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 4, p. 342-348, 2013.

LEWIS, M. D.; KELLY, J. M. Putting infection dynamics at the heart of Chagas disease. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 11, p. 899–911, 2016.

LIMBAN, C.; MARUTESCU, L.; CHIFIRIUC, M. C. Synthesis, spectroscopic properties and antipathogenic activity of new thiourea derivatives. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7593-7607, 2011.

MACHADO, F. S.; DUTRA, W. O.; ESPER, L.; GOLLOB, K. J.; TEIXEIRA, M. M.; FACTOR, S. M.; GARG, N. J. Current understanding of immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012.

MADDANI, M. R.; PRABHU, K. R. A concise synthesis of substituted thiourea derivatives in aqueous medium. **Journal of Organic Chemistry**, v. 75, n. 7, p. 2327–2332, 2010.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMÕES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p. 1109–1123, 2007.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA, M. D. S.; RAMOS JR, A. N.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Systematic Review: Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 19, n. 8, p. 943–957, 2014.

MEIS, J.; CASTRO, R. S. S. Manual para diagnóstico em doença de Chagas para microscopistas de base do estado do Pará. 1ª ed. Rio de Janeiro, 2017.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; DE CASTRO, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and

bioenergetics. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

MERTSCHENK, B.; KNOTT, A.; BAUER, W. Thiourea and thiourea derivatives. **Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry**, p. 1-15, 2013.

MISHRA, A.; BATRA, S. Thiourea and guanidine derivatives as antimalarial and antimicrobial agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 16, p. 2011–2025, 2013.

MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. Control of transfusional transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p. 64-67, 2011.

PARVEEN, S.; TONG, K.; RAUF, M.; KUBANIK, M.; SHAHEEN, M.; SOEHNEL, T.; HARTINGER, C. Coordination chemistry of organoruthenium compounds with benzoylthiourea ligands and their biological properties. **Chemistry–An Asian Journal**, 2019.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 6736, n. 17, p. 1–13, 2017.

PESTKA, S.; KRAUSE, C. D.; WALTER, M. R. Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. **Immunological Reviews**, v. 202, p. 8–32, 2004.

PINHEIRO, E.; BRUM-SOARES, L.; REIS, R.; CUBIDES, J. C. Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 296-300, 2017.

PISSETTI, C. W.; CORREIA, D.; DE OLIVEIRA, R. F.; LLAGUNO, M. M.; BALARIN, M. A. S.; SILVA-GRECCO, R. L.; RODRIGUES JUNIOR, V. Genetic and functional role of TNF-alpha in the development *Trypanosoma cruzi* infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. 976, 2011.

POVEDA, C.; FRESNO, M.; GIRONÈS, N.; MARTINS-FILHO, O. A.; RAMÍREZ, J. D.; SANTI-ROCCA, J.; GUHL, F. Cytokine profiling in Chagas disease: Towards understanding the association with infecting *Trypanosoma cruzi* discrete typing units (A benefit trial sub-study). **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1–8, 2014.

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

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A. Chronic Chagas cardiomyopathy: A review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the benzimidazole evaluation for interrupting trypanosomiasis (BENEFIT) trial. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 224–235, 2017.

RAUF, M. K.; TALIB, A.; BADSHAH, A.; ZAIB, S.; SHOAB, K.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Solution-phase microwave assisted parallel synthesis of N, N'-disubstituted thioureas derived from benzoic acid: Biological evaluation and molecular docking studies. **European journal of medicinal chemistry**, v. 70, p. 487-496, 2013.

SAEED, A.; FLÖRKE, U.; ERBEN, M. F. A review on the chemistry, coordination, structure and biological properties of 1-(acyl/aroil)-3-(substituted) thioureas. **Journal of Sulfur Chemistry**, v. 35, n. 3, p. 318-355, 2013.

SAEED, A.; KHAN, M. S.; RAFIQUE, H.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Design, synthesis, molecular docking studies and in vitro screening of ethyl 4-(3-benzoylthioureido) benzoates as urease inhibitors. **Bioorganic chemistry**, v. 52, p. 1-7, 2014.

SALES JUNIOR, P. A. S.; MOLINA, I.; MURTA, S. M. F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; SALVADOR, F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; POU, D.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; CABEZOS, J.; MOLINA, I. *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic country: epidemiological and clinical profile. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 7, p. 706–712, 2014.

SANNA, G.; MADEDDU, S.; GILIBERTI, G.; PIRAS, S.; STRUGA, M.; WRZOSEK, M.; STEFANSKA, J. Synthesis and biological evaluation of novel indole-derived thioureas. **Molecules**, v. 23, n. 10, p. 2554, 2018.

SANTOS, D. S. DOS. **Órgãos alvo do *Trypanosoma cruzi* em modelo experimental de fase aguda da doença de Chagas por transmissão oral**. 2016. 77f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2016.

SARTORI, A. M. C.; NETO, J. E.; NUNES, E. V.; BRAZ, L. M. A.; CAIAFFA-FILHO, H. H.; OLIVEIRA JR, O. D. C.; SHIKANAI-YASUDA, M. A. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: Comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 6, p. 872–875, 2002.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 75–85, 2007.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N.B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.

SOBRINHO, J. L. S.; MEDEIROS, F. P. D. M.; DE LA ROCA, M. F.; SILVA, K. E. R.; LIMA, L. N. A.; NETO, P. J. R. Delineamento de alternativas terapêuticas para o tratamento da doença de Chagas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 36, n. 2, p. 103-118, 2007.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 317, 2014.

SUNDURU, N.; SRIVASTAVA, K.; RAJAKUMAR, S.; PURI, S. K.; SAXENA, J. K.;

CHAUHAN, P. M. Synthesis of novel thiourea, thiazolidinedione and thioparabanic acid derivatives of 4-aminoquinoline as potent antimalarials. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 19, n. 9, p. 2570–2573, 2009.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. Interactive multimedia to teach the life cycle of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 6, n. 8, p. 1749, 2012.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 472–481, 2001.

VIANA, G. M.; SOARES, D. C.; SANTANA, M. V.; DO AMARAL, L. H.; MEIRELES, P. W.; NUNES, R. P.; CASTRO, H. C. Antileishmanial thioureas: Synthesis, biological activity and in silico evaluations of new promising derivatives. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 65, n. 10, p. 911-919, 2017.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: < <https://www.who.int/chagas/en/> >, 2017.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease**. Disponível em: < <http://www.who.int/chagas/en/>>, 2018

WHO, World Health Organization. **Chagas disease in Latin America: an epidemiological update based on 2010 estimates**. Weekly Epidemiological Record = Relevé épidémiologique hebdomadaire, v. 90, n. 06, p. 33-44, 2015.

YOSHIDA, N. *Trypanosoma cruzi* infection by oral route: how the interplay between parasite and host components modulates infectivity. **Parasitology international**, v. 57, n. 2, p. 105-109, 2008.

ZHANG, F.; DU, J.; WANG, Q.; HU, Q.; ZHANG, J.; DING, D.; ZHOU, H. Discovery of N-(4-sulfamoylphenyl)thioureas as *Trypanosoma brucei* leucyl-tRNA synthetase inhibitors. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 11, n. 32, p. 5310, 2013.

ANEXO

4. ARTIGO

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E IMUNOMODULADORA DE BENZOILTIOUREIAS SOBRE *Trypanosoma cruzi*

Bruna Terceiros Fernandes¹, Patrícia Moraes Lopes Pereira¹, Sueli Fumie Yamada-Ogatta¹, Lucy Megumi Yamauchi¹

¹ Departamento de Microbiologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brasil.

1. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é uma doença tropical negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Acomete principalmente populações da América latina, onde a doença é considerada endêmica (SALES-JUNIOR et al., 2017). Aproximadamente 8 milhões de pessoas estão infectadas no mundo todo e cerca de 25 milhões correm o risco de contrair a doença (WHO, 2018). O parasito *T. cruzi* possui um ciclo evolutivo complexo, apresentando três diferentes formas evolutivas: epimastigotas e amastigotas, que são as formas replicativas não infectantes, e tripomastigotas, que são formas não replicativas e infectantes, que se alternam entre hospedeiro invertebrado e vertebrado (DE SOUZA; DE CARVALHO; BARRIAS 2010; FRANCISCO et al., 2017).

Clinicamente, a doença de Chagas apresenta duas fases. A fase aguda se estabelece imediatamente após a infecção, pode ser assintomática, ou apresentar sintomas gerais e característico do local de penetração dos parasitos. Essa fase dura de 4 a 8 semanas, período em que o sistema imune do hospedeiro controla a replicação dos parasitos na corrente sanguínea e as manifestações clínicas desaparecem, iniciando a fase crônica de infecção. Nessa fase, o paciente pode permanecer assintomático para o resto da vida ou a doença pode progredir para a forma cardíaca ou gastrointestinal (BERN, 2015).

Benzonidazol (BZ) e Nifurtimox (NFX) são os únicos fármacos utilizados no tratamento da doença de Chagas. Mas somente o BZ é comercializado no Brasil, pois o NFX apresenta efeitos colaterais mais intensos, mesmo em baixas doses

(SALOMON, 2012). O mecanismo de ação do BZ ocorre por meio de estresse redutivo, através de ligações covalentes dos metabólitos reduzidos sobre as macromoléculas do parasito, como DNA, proteínas e lipídios. Ou também podem atuar no aumento da fagocitose, elevando a produção de citocinas (IFN- γ) causando a lise celular dos parasitos (RAJÃO et al., 2014).

Apesar de ser o único medicamento utilizado no tratamento, o BZ está longe de ser considerado um fármaco ideal e eficiente para o tratamento da doença de Chagas. Apresentam eficiência de cura limitada, cerca 76% em pacientes na fase aguda e apenas 8% na fase crônica (CANÇADO, 2002). Além do longo tempo de tratamento, fortes efeitos colaterais, abandono do tratamento pelos pacientes, e a resistência de cepas de *T. cruzi* a ambas as substâncias utilizadas atualmente no tratamento (SALES-JÚNIOR et al., 2017).

O desenvolvimento de novas classes de medicamentos que possam reduzir a toxicidade no paciente, apresentar cura eficiente em todas as fases da doença, baixas doses de administração, curto período de tratamento e menos riscos de desenvolverem resistência são extremamente necessários. Por essa razão, estudos de novos compostos de origem natural ou sintética, síntese de novas substância e a alteração molecular de compostos já existentes vem ganhando cada vez mais importância (FIELD et al., 2017).

Tioureia é um composto orgânico formado por moléculas de carbono, nitrogênio, enxofre e hidrogênio ($\text{CH}_4\text{N}_2\text{S}$) (PAIVA, 2011). Por ser uma molécula versátil quimicamente é muito utilizada na síntese orgânica para construção de uma variedade de derivados com estruturas químicas mais complexas e características biológicas e farmacológicas importantes (RAUF et al., 2013). Muitas pesquisas já revelaram uma série de derivados de tioureia com atividades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias (MADDANI; PRABHU, 2010). Dentre elas, destaca-se as benzoiltioureias que possuem como característica a presença da benzamida, um derivado do ácido benzoico, presente em sua estrutura química e tem demonstrado ampla atividade inibitória contra diferentes microrganismos (SAEED et al., 2014; BRITO et al., 2018).

No entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dos derivados de tioureia contra doenças causadas por protozoários, entre elas a doença de Chagas. Pela necessidade no desenvolvimento de novas substâncias alternativas ao tratamento atual e melhor eficácia nos efeitos tripanocidas, este estudo teve como

objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e o mecanismo de ação *in vitro* de duas Benzoiltioureias sobre *Trypanosoma cruzi* e suas propriedades imunomoduladoras sobre células mamíferas infectadas por *T. cruzi*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Substâncias sintéticas: Benzoiltioureias

As benzoiltioureias foram sintetizadas e cedidas pela equipe da Profa. Dra Marcelle de Lima Ferreira Bispo do Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina. As soluções estoque de RTB02 *N*-(cicloexilcarbamoil)benzamida (Figura 1A) e RTB62 *N*-((4-(*terc*-butil)fenil)carbamoil)benzamida (Figura 1B) foram preparadas a 25 mg/mL e solubilizadas em Dimetilsulfóxido (DMSO) 10% e diluídos em meio Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) com concentrações finais não excedendo 1% de DMSO.

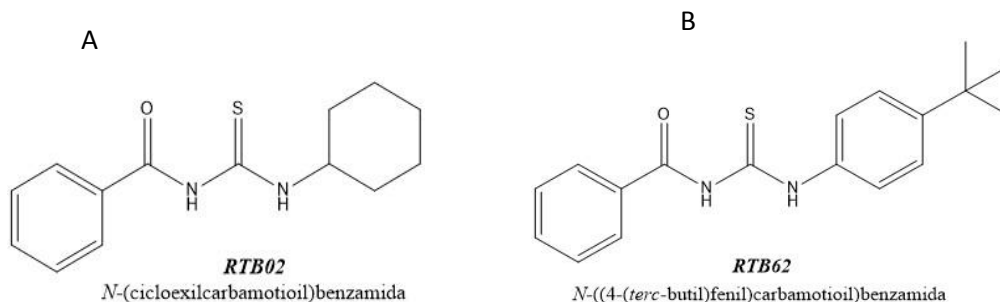


Figura 1. Estrutura química das Benzoiltioureias RTB02 (A) e RTB62 (B).

2.2 Formas Evolutivas de *T. cruzi*

2.2.1 Forma Epimastigota

As formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) (SILVA; NUSSENZWEIG, 1953) foram cultivadas a 28°C em meio Liver Infusion Tryptone (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFB) (GIBCO[®] Invitrogen). As culturas celulares foram submetidas a repique a cada 72 horas (CAMARGO, 1964).

2.2.2 Formas Tripomastigotas e Amastigotas

As formas tripomastigotas foram adquiridas por meio da coleta de sangue por punção cardíaca de camundongos BALB/c machos infectados por *T. cruzi* (cepa Y). O sangue foi acondicionado em garrafas plásticas, e as formas tripomastigotas e amastigotas foram mantidas pela infecção e expansão em cultura celular de LLCMK₂ (células epiteliais de rim de *Macaca mulatta*) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C em estufa a 5% de CO₂.

2.3 Células Aderentes do Exsudato Peritoneal

Os animais utilizados para a coleta de células aderentes do exsudato peritoneal foram adquiridos no Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá e mantidos ao decorrer dos experimentos no Biotério da Universidade Estadual de Londrina, em gaiolas, condições livres de patógenos, alimentação a base de ração e água *ad libitum*, em ambiente com temperatura entre 18 e 22°C e umidade entre 45% e 55%, ciclo claro/escuro de 12 h. Foram utilizados camundongos machos, BALB/c, de 7 a 8 semanas de idade. As células foram coletadas por meio da inoculação e aspiração intraperitoneal de 5 mL de solução tampão fosfato-salino (PBS). As células obtidas do aspirado foram submetidas a centrifugação, coradas com azul de tripan e contadas em Câmara de Neubauer no microscópio óptico (HIDEKO TATAKIHARA et al., 2008). Esse estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (UEL), Paraná, Brasil, (Número 15516.2018.20).

2.4 Análise de Citotoxicidade

Um inóculo de 100 µL contendo 2x10⁵ células/poço de células aderentes do exsudato peritoneal em meio DMEM com 10% de SFB foram dispostas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37°C para adesão e formação da monocamada. Após esse período, os poços foram lavados com PBS para remoção de células não aderentes e adicionados diferentes concentrações de RTB02 e RTB62 (25 a 0,78 µg/mL) e novamente incubados a 37°C, 5% CO₂ por 48 h. A viabilidade celular foi determinada pelo método de redução do MTT (brometo de dimetiltiazol difenil

tetrazólio) submetido a leitura no espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek, Winooski, EUA) na absorvância de 540 nm (KIAN et al., 2018).

2.5 Atividade antimicrobiana das Benzoiltioureias *in vitro* sobre as formas evolutivas de *T. cruzi*

2.5.1 Efeito no Crescimento de Epimastigota

Uma suspensão de 1×10^6 parasitos/mL foram acondicionados em meio LIT e depositadas em placas de 24 poços contendo concentrações crescentes de benzoiltioureias, RTB02 e RTB62 (1,56 a 50 $\mu\text{g/mL}$) não excedendo o volume final de 1 mL por poço. A placa permaneceu incubada a 28°C por 72 h. Cultura de parasitos sem tratamento foram utilizados como controle. Para determinar o efeito das benzoiltioureias sobre o crescimento dos epimastigotas, foram coletados 10 μL da suspensão dos poços para observação e contagem direta das células no microscópio óptico. Os resultados foram interpretados através do cálculo de IC_{50} e IC_{90} (menor concentração capaz de inibir 50% e 90% do crescimento dos parasitos, respectivamente) (LANCHEROS et al., 2018). A curva de crescimento foi realizada sob as mesmas condições de tratamento, incubação e concentrações de parasitos descritos acima, no entanto, as contagens diretas dos parasitos no microscópio óptico foram realizadas por 4 dias consecutivos, no intervalo de 24 h a cada contagem.

2.5.2 Efeito na Viabilidade de Tripomastigota

As formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante da cultura de células LLCMK₂ infectadas previamente por *T. cruzi*, em uma densidade de 1×10^7 células/mL. As células foram incubadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB em placas de 24 poços com concentrações crescentes de Benzoiltioureias RTB02 e RTB62 (3,12 a 50 $\mu\text{g/mL}$). As placas permaneceram incubadas a 37°C por 24 h a 5% de CO₂. A viabilidade foi determinada pela contagem de parasitos vivos em microscópio óptico (IZUMI et al., 2012).

2.5.3 Efeito na Proliferação de Amastigotas Intracelulares

Uma suspensão de 2×10^5 células aderentes do exsudato peritoneal/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB foram transferidas para a superfície de lamínulas de vidro (13 mm) dispostas em placas de 24 poços, para adesão e formação da monocamada celular. Após incubação a 37°C por 24 h a 5% de CO_2 os poços foram lavados com PBS e adicionados 1×10^6 parasitos/mL de tripomastigotas em meio DMEM, e incubados por 2 h. Os poços foram lavados novamente com PBS e um novo meio contendo concentrações crescentes de Benzoiltioureias RTB02 (1,56 a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e RTB62 (0,78 a 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram adicionados aos poços. A placa permaneceu incubada por 48 h a 37°C e 5% CO_2 . As células foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e as lamínulas coladas sobre lâminas de vidro. 200 células foram contadas no microscópio óptico e o índice de infecção foi determinado pela porcentagem de células infectadas X número médio de parasitos por célula infectada (BARRIAS et al., 2010).

O sobrenadante dos poços foram coletados para a determinação dos níveis de óxido nítrico.

2.5.4. Mecanismos de Ação das Benzoiltioureias sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

2.5.4.1 Avaliação das Alterações Morfológicas e Ultraestruturais de epimastigotas

As formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com concentrações correspondentes ao IC_{50} e IC_{90} da RTB02 (5,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 21,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e RTB62 (0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 9,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 72 h a 28°C . Após incubação, os parasitos foram lavados com PBS e fixados com 2,5% glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 por 24 h. As amostras foram pós-fixadas em uma solução contendo 1% de tetróxido de ósmio e 0,8% de ferrocianeto de potássio em tampão cacodilato 0,1 M por 1 h. Após fixação, os parasitos foram desidratados em diferentes concentrações de acetona e embebidos em resina Epon por 72 h a 60°C . Secções ultrafinas foram coradas com 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JM 1400 TEM (JEOL Ltda, Tokyo, Japan) (MARTINS et al., 2016).

2.5.4.2 Efeito na produção de espécies reativas de oxigênio total (EROs) em epimastigotas

Para detecção da produção de EROs, 1×10^6 epimastigotas foram cultivados em placas de 24 poços tratados com concentrações correspondentes ao IC_{50} e IC_{90} da RTB02 (5,71 $\mu\text{g/mL}$ e 21,41 $\mu\text{g/mL}$) e RTB62 (0,98 $\mu\text{g/mL}$ e 9,37 $\mu\text{g/mL}$). Após incubação por 72 h, foram adicionados nos poços, 10 μM da sonda H_2DCFDA (6-carboxy-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, diacetoxymethyl ester) por 45 min em ausência de luz. No controle positivo foi utilizado 20 mM de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A produção de EROs produzidos pelos epimastigotas foi avaliada pela fluorescência emitida na redução da sonda H_2DCFDA em diclorofluoresceína (DCF). De acordo com comprimentos de leitura de excitação (490 nm) e emissão (535 nm) no espectrofluorímetro VICTOR™ X3, PerkinElmer (SHUKLA et al., 2012).

2.5.4.3 Efeito na formação de corpos lipídicos em epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram tratadas com IC_{50} e IC_{90} da RTB02 (5,71 $\mu\text{g/mL}$ e 21,41 $\mu\text{g/mL}$) e RTB62 (0,98 $\mu\text{g/mL}$ e 9,37 $\mu\text{g/mL}$) no período de 72 h. Após, foram adicionados nos poços, 10 $\mu\text{g/mL}$ de vermelho do Nilo (9-dietilamino-5H-benzo(α)fenoxazina-5-ona), incubados por 30 min. Como o vermelho do Nilo é um marcador fluorescente e se associa às moléculas lipídicas neutras, pode-se mensurar o seu acúmulo nos corpos lipídicos por meio de leitura em espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer) nos comprimentos de ondas de excitação 490 nm e emissão 535 nm (STEFANELO et al., 2014).

2.5.4.4 Avaliação da Peroxidação Lipídica em epimastigotas

Epimastigotas tratados com RTB02 e RTB62 (IC_{50} e IC_{90}) por 72 h foram incubados com 50 μM da sonda DPPP (Diphenyl-1-pyrenylphosphine) por 15 min a 22°C. 20 mM de H_2O_2 foi usado como controle positivo. A sonda DPPP, quando na presença de peróxidos, é oxidada a um óxido de fosfina (DPPP-O) com capacidade de emissão de fluorescência detectada pelo espectrofluorímetro (VICTOR™ X3, PerkinElmer) na excitação e emissão de 355nm e 460nm, respectivamente (OKIMOTO et al., 2000).

2.5.4.5 Determinação da Integridade da membrana celular em epimastigotas

Epimastigotas tratados com as Benzoiltioureas RTB02 e RTB62 (IC_{50} e IC_{90}) por 72 h foram incubados com 0,2 $\mu\text{g/mL}$ de sonda iodeto de propídeo (IP) em temperatura ambiente por 10 min. Células que se encontram com a membrana alterada e desintegrada facilitam a entrada da sonda IP que se liga ao DNA emitindo uma alta fluorescência. Quando as membranas celulares estão íntegras, sem alterações, dificulta a entrada da sonda, ocorrendo baixa emissão de fluorescência. Análises de emissão de fluorescência da membrana celular dos parasitos tratados e não tratados foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o software CellQuest. 40 μM de digitonina foi utilizada como controle positivo. Alterações na fluorescência de IP foram quantificadas de acordo com o percentual de alterações na membrana plasmática das células tratadas em comparação ao grupo de células não tratadas (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016).

2.5.4.6 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial de epimastigotas

Formas epimastigotas foram tratadas com RTB02 e RTB62 (IC_{50} e IC_{90}) pelo período de 72 h. Após, foram adicionados nos poços, 5 $\mu\text{g/mL}$ do corante fluorescente Rodamina 123 (Rh123) incubados por 15 min a 37°C. Células que possuem a membrana mitocondrial inalteradas capturam o corante Rh123 emitindo alta fluorescência. Mas quando há alterações no potencial de membrana ocorre a saída da Rh123 da mitocôndria, causando baixos índices de fluorescência. As análises foram realizadas em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o software CellQuest e as alterações fluorescentes do Rh123 foram quantificados pelo índice de variação (IV) obtido da equação $(MT - MC) / MC$. MT corresponde a mediana de fluorescência para os parasitos tratados e MC é a mediana de fluorescência para os parasitos controle. Valores IV negativos correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016).

2.5.4.7 Verificação do volume celular de epimastigotas

Epimastigotas foram tratados com RTB02 e RTB62 (IC_{50} e IC_{90}) pelo período de 72 h. Após seguidas lavagens foram submetidos a análises de volume celular no

citômetro de fluxo FACSCalibur. Os histogramas foram gerados e a análise foi realizada usando o software CellQuest. Foi utilizado como controle positivo 20 mM da substância tóxica actinomicina D (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016).

2.5.4.8 Avaliação do ciclo celular de epimastigotas

Epimastigotas foram tratados com RTB02 e RTB62 (IC₅₀ e IC₉₀) pelo período de 74 h. Após, foram fixados em metanol/PBS 70% por 1 h a 4°C. Foram realizadas lavagens dos parasitos em PBS e adicionados 10 µl de IP-RNase A (Iodeto de propídio – ribonuclease A) e incubados por 45 min a 4°C. As análises foram realizadas no citômetro de fluxo FACSCalibur e utilizado o software CellQuest. Assim, foi estabelecido a porcentagem de células em cada estágio do ciclo celular (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016).

2.6 Atividade imunomoduladora das Benzoiltioureias *in vitro* sobre células aderentes do exsudato peritoneal infectados por *T. cruzi*

2.6.1 Avaliação dos níveis de Óxido Nítrico (NO)

A produção de óxido nítrico foi estabelecida pela mensuração dos níveis de nitrito acumulados no sobrenadante do teste descritos em 2.5.3 pela técnica de Griess. O sobrenadante dos ensaios foram transferidos para placas de 96 poços juntamente com o reagente de Griess (1% sulfanilamida, 0,1% de dicloridrato N-(1-naftil) etilenodiamina e ácido fosfórico a 2,5%) por 10 min em temperatura ambiente e sem iluminação. As amostras dos poços foram analisadas em leitor de placas (Synergy HT, Biotek, EUA) na absorvância de 540 nm. As concentrações de nitrito foram calculadas com referência a curva padrão conhecida de nitrito de sódio (KIAN et al., 2018).

2.6.2 Determinação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A densidade de 2×10^5 células/mL de células aderentes do exsudato peritoneal em meio DMEM foram dispensadas em placas de 96 poços pretas, para adesão. Após incubação a 37°C por 24 h foram adicionados nos poços 1×10^6 tripomastigotas/mL

para infecção pelo período de 2 h a 37°C em 5% de CO₂. Os poços foram lavados com PBS e tratados com diferentes concentrações de RTB02 e RTB62 (0,78 a 25 µg/mL) por 48 h sob as mesmas condições. Nos poços do controle positivo 0,03% de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foram colocados e o controle negativo não recebeu nenhum tratamento. As amostras foram submetidas a uma primeira leitura no fluorômetro Perkin-Elmer Victor (a λ_{ex} = 490 nm e λ_{em} = 525 nm). Para a segunda leitura, foram adicionados em todos os poços, 2 µM da sonda fluorescente H₂DCFDA (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e permaneceram incubadas a 37°C, 5% de CO₂, sem iluminação ao longo de 30 min. Através do aumento da fluorescência promovido pela conversão do 2',7'- diclorofluoresceína (DFA) a produção total de EROs foi estabelecida (KIAN et al., 2018).

2.6.3 Avaliação da Expressão Relativa de genes de macrófagos Infectados por *T. cruzi*

Em placas de 24 poços foi depositado uma densidade de 1x10⁶ células aderentes do exsudato peritoneal em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 h de incubação em 37°C a 5% de CO₂, foram adicionados nos poços 1x10⁷ tripomastigotas/mL e incubados por 2 h sob as mesmas condições de temperatura. Os poços foram tratados com concentrações referente ao IC₅₀ da RTB02 e RTB62 e a placa permaneceu incubada por 48 h. Após, as células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi* tratadas e não tratadas e células não infectadas e não tratadas foram submetidas a extração de RNA total pelo kit SV Total RNA Isolation System (Promega, Madison, EUA) seguindo o protocolo do fabricante. A concentração de RNA foi determinada por medidas de absorvância (260 nm) com um espectrofotômetro (Synergy HT, Biotek, Winooski, EUA). Utilizou-se 500 ng de RNA total para realizar a síntese do DNA complementar por reação de transcrição reversa, usando o iniciador Oligo (dT) 2 µM e transcriptase reversa M-MLV (Invitrogen, Carlsbad, EUA), seguindo o procedimento do fabricante. A PCR em tempo real foi realizada no equipamento Rotor-Gene Q (Qiagen, Hilden, Alemanha). Em um volume final de 20 µL, foram adicionados 50 ng de modelo de cDNA, 2 µM de cada primers (Tabela 1) e kit qPCR QuantiNova SYBR Green (Qiagen, Hilden, Alemanha). O perfil do ensaio consistiu em 10 min a 95 °C e 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C e 30 s a 72 °C, seguidos por análise da curva de fusão (60-95 °C a 0,5 °C/ s). Após a

amplificação, os valores limiares do ciclo foram normalizados e utilizados para determinar os níveis significativos de expressão gênica utilizando o software REST2009 (Qiagen, Hilden, Alemanha). A β -actina foi usada como gene de referência para análises comparativas do método do limiar do ciclo (KIAN et al., 2018). Os ensaios foram realizados em triplicata em três ocasiões diferentes.

Tabela 1. Sequência de iniciadores usados no PCR em tempo real (KIAN et al., 2018).

Iniciadores	Senso	Antisenso
TNF-α	tgtgctgacagcttcaaca	cttgatggtgcatgaga
IL-10	tggacatactgctaaccg	ggatcattccgataaggct
TGF-β	gctgaaccaaggagacggaat	gctgatcccgttgattcca
Nrf-2	tcacacgagatgagcttagggcaa	tacagttctggcgccgactttat
HO-1	cccaaaactggcctgtaaaa	cgtggcagtcaacatggat
Ferritina	ttccaggatgtgcagaagcc	aagagggcctgattcaggttc
β-actina	agctgcgttttacacccttt	aagccatgccaatgtgtct

2.7 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, EUA). As diferenças significativas foram avaliadas pela Análise de Variância (ANOVA), com o teste de comparação múltipla de Tukey. Considerando os resultados significativos em que $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1 RTB02 e RTB62 inibem o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*

Inicialmente foi realizado o ensaio de atividade antimicrobiana das benzoiltioureias RTB02 e RTB62 para verificar o efeito das substâncias sobre o crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y). Os ensaios mostraram que ambas as substâncias apresentaram efeito dose-dependente (Figura 2). A RTB02 apresentou inibição de 50% (IC₅₀) no crescimento dos parasitos na concentração de 5,71 μ g/mL e 90% (IC₉₀) de inibição em 21,41 μ g/mL (Figura 2A). Para RTB62, as concentrações IC₅₀ e IC₉₀ foram de 2,75 μ g/mL e 11,42 μ g/mL, respectivamente

(Figura 2B). As duas substâncias foram capazes de inibir 100% do crescimento na maior concentração testada, 50 µg/mL. Interessantemente, pode-se observar uma melhor atividade antiproliferativa da RTB62.

As mesmas concentrações das substâncias usadas no teste de inibição do crescimento foram utilizadas para analisar a curva do tempo de início da ação e duração da inibição dos parasitos tratados. Os grupos controle (não tratado) das duas substâncias apresentaram crescimento exponencial após 48 horas de cultivo. Nesse mesmo tempo, nos grupos tratados, pode-se observar o início da inibição mesmo nas concentrações mais baixas testadas (1,56 µg/mL), tanto RTB02 (Figura 3A) como RTB62 (Figura 3B) apresentaram diferenças significativas com relação ao grupo controle não tratado, no entanto, corroborando com o teste anterior, a RTB62 apresentou diferença significativa mais pronunciada na inibição do crescimento dos parasitos comparado ao controle. A utilização de DMSO para solubilização das substâncias, não interferiu no crescimento dos parasitos (dados não mostrados).

3.2 RTB02 e RTB62 atuam na viabilidade das formas tripomastigotas de *T. cruzi*

Com relação as formas tripomastigotas, verificamos que as duas substâncias foram capazes de inibir a viabilidade de tripomastigotas. Verificamos que a substância RTB62 apresentou efeito inibitório em todas as concentrações testadas (3,12 µg/mL a 50 µg/mL), apresentando IC₅₀ de 1,4 µg/mL e IC₉₀ de 15,61 µg/mL (Figura 4B). Enquanto a RTB02 apenas nas concentrações de 6,25 µg/mL a 50 µg/mL apresentou efeito inibitório, apresentando IC₅₀ de 14,41 µg/mL e IC₉₀ de 40,58 µg/mL (Figura 4A). Verificamos ainda, que ambas as substâncias tiveram efeito dose-dependente.

3.3 RTB02 e RTB62 diminuem a proliferação das formas amastigotas de *T. cruzi*

As benzoiltioureas foram avaliadas quanto à capacidade de inibir a multiplicação de amastigotas. Para as formas intracelulares, ambas as substâncias foram capazes de diminuir a proliferação após 48 h de tratamento (Figura 5A e 5B). Para a RTB02 as concentrações de IC₅₀ e IC₉₀ foram de 6,50 µg/mL e 25,37 µg/mL, respectivamente. RTB62 apresentou a concentração de IC₅₀ de 6,85 µg/mL e IC₉₀ de 26,07 µg/mL.

As concentrações que inibiram 50% da proliferação de amastigotas não apresentaram potenciais citotóxicos em células aderentes do exsudato peritoneal de camundongos, CC_{50} de 19,06 $\mu\text{g/mL}$ para RTB02 e 18,67 $\mu\text{g/mL}$ RTB62 após 48 horas de tratamento. O índice de seletividade para RTB02 foi de 2,95 $\mu\text{g/mL}$ e 4,45 $\mu\text{g/mL}$ para RTB62.

3.4 RTB02 e RTB62 causam alterações morfológicas e ultraestruturais em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Os resultados da atividade antimicrobiana das benzoiltioureas mostraram que elas atuam sobre todas as formas de *T. cruzi*. Assim, os ensaios para avaliar as alterações morfológicas e bioquímicas e o tipo de morte celular decorrentes ao uso das substâncias foram realizados.

As formas epimastigotas foram tratadas com as concentrações de IC_{50} e IC_{90} das substâncias para avaliar as alterações morfológicas e ultraestruturais. As imagens da microscopia eletrônica de transmissão dos parasitos não tratados (controle) mostraram estruturas normais, com características morfológicas e ultraestruturas próprias das formas epimastigotas (Figura 6A e 6B). Quando submetidos ao tratamento com as benzoiltioureas, verificou-se mudanças morfológicas e ultraestruturais, desorganização das organelas intracelulares, tanto para os tratamentos com RTB02 quanto RTB62 (Figura 6C, 6D, 6E e 6F). Desorganização do complexo de Golgi (Figura 6C, 6D e 6F), alterações nos vacúolos (Figura 6C, 6D e 6F) e inchaço na mitocôndria dos parasitos tratados com IC_{90} da RTB62 (Figura 6F).

3.5 RTB62 aumentam as Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para avaliar se as EROs estão envolvidas na morte celular das formas epimastigotas, culturas celulares foram tratadas com concentrações de IC_{50} e IC_{90} das substâncias. Os resultados mostram que os valores de EROs produzidas pelos tratamentos referentes a IC_{50} de RTB02 e RTB62 não obtiveram diferenças significativas em relação ao controle negativo, parasito não tratado (Figura 7A e 7B). Somente os tratamentos com as concentrações de IC_{90} da RTB02 e RTB62 apresentaram aumento significativo na produção de EROs pelos epimastigotas em

relação ao controle negativo (Figura 7A e 7B).

3.6 RTB02 e RTB62 reduzem a formação de corpos lipídicos nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para confirmar os resultados das imagens de microscopia que mostraram que não há formação de corpos lipídicos, foi realizado os ensaios de quantificação dos mesmos. Os resultados mostram que ambas as substâncias não foram capazes de aumentar os valores referentes à formação de corpos lipídicos após tratamento de epimastigotas com IC₅₀ e IC₉₀ das benzoiltioureas (Figura 7 C e D). E sim, principalmente nos tratamentos com RTB62 houve uma diminuição significativa na formação dos corpos lipídicos comparados ao grupo controle negativo (não tratados).

3.7 RTB02 e RTB62 induzem peroxidação lipídica em formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para verificar se os parasitos estavam sofrendo estresse oxidativo, foram avaliados os níveis de peroxidação lipídica. Os resultados mostram que os epimastigotas tratados com as duas benzoiltioureas foram capazes de aumentar significativamente a peroxidação lipídica em todas as concentrações testados comparados ao grupo controle negativo, parasitos não tratados (Figura 7 E e F). Interessantemente, o tratamento com RTB62 (Figura 7F) apresentou aumento mais significativo quando comparado a RTB02 (Figura 7E).

3.8 RTB02 e RTB62 não alteram a integridade da membrana celular nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

Para avaliar se os parasitos mantiveram a integridade da membrana celular, os epimastigotas foram tratados e avaliados quanto a capacidade de entrada de iodeto de propídio na célula e ligação ao DNA. Os resultados mostraram que as benzoiltioureas RTB02 e RTB62 não foram capazes de causar a ruptura da membrana celular nas formas epimastigotas comparados ao grupo controle negativo, parasitos não tratados (Figura 8 A e B).

3.9 RTB02 e RTB62 alteram o potencial de membrana mitocondrial nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

Verificamos que os tratamentos dos epimastigotas com RTB02 e RTB62 foram capazes de alterar o potencial de membrana mitocondrial (Figura 8 C e D). Os resultados mostraram que o tratamento com a RTB02 (Figura 8C) na concentração de IC₉₀ causou despolarização mitocondrial devido à redução na intensidade fluorescente do marcador Rh123 comparado ao grupo controle não tratado. Quando os parasitos foram tratados com RTB02 na concentração de IC₅₀, não houve alteração no potencial de membrana mitocondrial. Já para a substância RTB62 (Figura 8D), os resultados mostram uma hiperpolarização significativa quando tratados na concentração do IC₉₀. Com relação ao tratamento com a substância na concentração de IC₅₀ não houve diferença significativa em relação ao grupo controle não tratado.

3.10 RTB02 diminui o volume celular das formas epimastigotas de *T. cruzi*

As imagens de microscopia mostraram alterações na forma celular, assim foi verificado se os tratamentos com as substâncias acarretam na perda de volume celular dos parasitos. Os resultados apresentados como histograma (Figura 8 E e F), mostraram que somente os tratamentos com IC₉₀ da substância RTB02 foram capazes de causar diminuição de 31,79% no volume celular de epimastigotas comparados ao grupo controle não tratado (Figura 8E). Na concentração do IC₅₀ a redução foi de 1,3%, não apresentando diferenças significativas. Os tratamentos com a substância RTB62 também não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle, tratamentos com IC₅₀ diminuíram apenas 2,81% e IC₉₀ 4,98% do volume celular (Figura 8F).

3.11 RTB02 altera o ciclo celular na fase G0/G1 nas formas epimastigotas de *T. cruzi*

Outra análise importante é a avaliação do ciclo celular. Os resultados mostraram que RTB02 foi capaz de interromper o ciclo celular na fase G0/G1 das formas epimastigotas. Os tratamentos com as concentrações referentes ao IC₅₀ e IC₉₀ causaram um aumento significativo no número de células na fase G0/G1 em

comparação com o grupo controle não tratado (Figura 9). Os tratamentos com RTB62 não apresentaram diferenças significativas com relação a grupo controle.

3.12 RTB02 e RTB62 não aumentam o potencial tripanocida de células aderentes do exsudato peritoneal infectados por *T. cruzi*

Espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico são moléculas químicas que atuam no controle parasitário intracelular de células infectadas por *T. cruzi*. Assim, a determinação desses produtos foi avaliada *in vitro*. Os resultados mostram que não há produção de EROs pelas células após o tratamento tanto com RTB02 como RTB62 (Figura 10 A e B). Observa-se produção de EROs apenas na maior concentração testada (25 µg/mL) tanto nos tratamentos com RTB02 e RTB62.

Em relação a produção de NO, os tratamentos com ambas as substâncias, em todas as concentrações testadas, não apresentaram diferenças significativas na produção de nitrito por células aderentes do exsudato peritoneal em comparação ao grupo controle não tratado (Figura 10 C e D).

3.13 RTB02 diminuem a expressão gênica de TGF-β, TNF-α e IL-10 e RTB62 aumenta a expressão de TGF-β em células aderentes do exsudato peritoneal infectados por *T. cruzi*

Com o objetivo de determinar a ação imunomoduladora das benzoiltioureias em células aderentes do exsudato peritoneal infectados, foram avaliados os níveis de RNA mensageiro dos genes IL-10, TGF-β e TNF-α por PCR em tempo real. O tratamento com a substância RTB02 apresentou uma diminuição da expressão gênica das citocinas IL-10, TGF-β, TNF-α (Figura 11 A). Já no tratamento com a RTB62 levou um aumento da expressão de TGF-β, as outras citocinas não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo de células infectadas e não tratadas (Figura 11 A).

3.14 RTB02 diminuem a expressão gênica de ferritina e ambas as substâncias diminuem a expressão de HO-1 em células aderentes do exsudato peritoneal infectados por *T. cruzi*

Como a atividade microbicida não estava ocorrendo via produção de NO ou

EROs, foi analisado se as benzoiltioureas estavam induzindo outros mecanismos relacionados ao metabolismo do ferro, modulação do sistema imune ou defesa antioxidante através da expressão de ferritina, heme oxigenase (HO-1) e Genes Nrf-2, respectivamente. Os tratamentos com a substância RTB02 causou nas células aderentes do exsudato peritoneal uma diminuição significativa na expressão dos genes ferritina, HO-1 e Nrf-2 (Figura 11 B). Já a expressão destes genes por células infectadas e tratadas com RTB62, não tiveram alterações significativas nas expressões dos mesmos (Figura 11 B).

5. DISCUSSÃO

Nenhum fármaco, além do Benzonidazol e Nifurtimox, atendeu até o momento, todos os requisitos necessários para se tornarem o tratamento ideal para a doença de Chagas. Dessa forma estudos de novas substâncias com melhor eficácia e poucos efeitos negativos são urgentemente necessários para o tratamento dessa doença tão negligenciada pelas indústrias farmacêuticas. Nosso estudo demonstrou que as benzoiltioureas RTB02 e RTB62 apresentaram atividade antiprotozoário contra as três diferentes formas evolutivas do parasito. A RTB62 apresentou melhores índices de inibição sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas. Para as formas amastigotas, ambas as substâncias inibiram eficientemente a proliferação intracelular, sem diferenças significativas entre elas. Diversos estudos já demonstraram o efeito antimicrobiano de derivados de tioureas. E outros, que sintetizaram benzoiltioureas, demonstraram a ação sobre bactérias, *Mycobacterium tuberculosis* (BRITO et al., 2018) *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae* e fungos, *Geotrichum candidum*, *Aspergillus fumigatus* e *Syncephalastrum racemosum* (MOHAMED; EL-GHANY; FAHMY, 2016).

Com relação aos epimastigotas, os testes do mecanismo de ação mostraram que tanto RTB02 quanto RTB62 aumentaram a produção de EROs, elevaram os níveis de peroxidação lipídica, alteraram o potencial de membrana mitocondrial e causaram alterações morfológicas e ultraestruturais nos parasitos. E RTB02 alterou o ciclo celular de epimastigotas na fase G0/G1.

Interessantemente, as duas benzoiltioureas apresentaram atividade antiproliferativa sobre as formas amastigotas intracelulares, no entanto, não há ativação da maquinaria microbicida (EROs e NO) e nem das vias relacionadas ao

metabolismo do ferro e defesa antioxidante pelas células aderentes infectadas, sugerindo uma ação direta das duas benzoiltioureas sobre o parasito.

Dentre as organelas do parasito, as mitocôndrias são importantes para a produção de energia pelo processo de respiração celular e é o principal local de produção de EROs. Mas, quando ocorre o aumento excessivo desses radicais livres intracelularmente, provocam danos nas organelas, no DNA, oxidação de proteínas, peroxidação lipídica e alterações estruturais, funcionais e de permeabilidade nas membranas mitocondriais e celulares, provocando a morte celular dos parasitos (KANG; PERVAIZ, 2012). A mitocôndria é considerada um dos principais alvos terapêuticos para o desenvolvimento de potenciais quimioterápicos contra a doença de Chagas (PITA; PASCUTTI, 2011).

Verificamos que as duas benzoiltioureas causaram alterações no potencial de membrana mitocondrial, RTB02 causou despolarização mitocondrial e RTB62 hiperpolarização. Alterações no potencial de membrana mitocondrial afetam a viabilidade celular, pois interferem na produção de ATP pela cadeia transportadora de elétrons no processo de respiração celular (JOSHI; BAKOWSKA, 2011). Essas alterações podem tanto ser causadas pelo aumento de espécies reativas, bem como, o aumento nessa produção, pode ser desencadeado por disfunções mitocondriais (VAMECQ et al., 2012). A hiperpolarização do potencial de membrana mitocondrial está totalmente relacionada ao aumento na produção de EROs (GERGELY et al., 2002) como verificado em nosso estudo.

Identificamos também, que os tratamentos dos epimastigotas com RTB02 interrompem o ciclo celular na fase G0/G1. O aumento das células identificadas nessa fase indica que a substância inibe a síntese e duplicação do DNA, causando fragmentação da cromatina nuclear, conseqüentemente diminuindo a proliferação das formas epimastigotas (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2016). A interrupção nessa fase do ciclo celular é uma característica importante e típica da morte celular por apoptose (KACZANOWSKI et al., 2011).

A morte celular pode ser causada por diferentes fatores químicos, físicos e naturais. E tem como função a eliminação de células desnecessárias ou que sofreram alterações e destruição dos seus componentes intracelulares (VANDEN BERGHE et al., 2010). A apoptose é um tipo de morte celular programada que apresenta características morfológicas e moleculares bem descrita para protozoários. Em tripanossomatídeos essas características incluem condensação e fragmentação do

DNA, diminuição do volume celular, alterações no potencial de membrana mitocondrial e exposição da fosfatidilserina (MENNA-BARRETO et al., 2009). Baseado nas alterações morfológicas das imagens da microscopia, nos resultados dos testes de mecanismo de ação sobre as formas epimastigotas, comparados aos tipos de morte celular, verificamos que as características encontradas em nosso estudo apresentam mais relação com a morte celular por apoptose, refletida nos resultados de alterações no potencial mitocondrial, produção de EROs e redução do volume celular.

NO e EROs são importantes moléculas citotóxicas produzidas por diferentes tipos de células mamíferas, e que atuam na defesa do organismo contra vários microrganismos. E é com a produção dessas moléculas que macrófagos eliminam formas intracelulares de *T. cruzi*, e quando inibidos favorecem o aumento do crescimento dos parasitos. Observamos no nosso estudo, que a atividade antiproliferativa das formas amastigotas intracelulares não foi causada pela produção de compostos químicos tripanocidas (EROs e NO) nem mesmo pelo aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias e vias moduladoras da resposta imune. Com exceção da RTB62, que apresentou um perfil anti-inflamatório decorrente do aumento de TGF- β . Do mesmo modo, Amorim et al, 2012, em seus estudos de ação da substância sintética 2- {2-[hidroxi (2-nitrofenil) metil] - acriloxi} benzoato de metila sobre espécies do gênero *Leishmania*, demonstraram que a atividade leishmanicida ocorreu não pela produção de NO, mas sim por meio de uma atividade imunomoduladora, com diminuição das citocinas antiinflamatórias IL-6 e IL-10, facilitando a ativação dos macrófagos e morte celular dos parasitos intracelulares.

Para a produção de NO, os macrófagos precisam ser ativados por citocinas inflamatórias, como, TNF- α e IFN- γ (VILA-DEL-SOL; DÍAZ-MUÑOZ; FRESNO, 2007). E a produção de citocinas TGF- β e IL-10 podem inibir a produção de NO (ANDRADE; GOLLOB; DUTRA, 2014). Nossos resultados mostraram que os tratamentos com RTB02 não aumentaram a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias pelas células aderentes, na verdade, ocorreu uma diminuição na expressão desses genes. A diminuição na expressão de TNF- α possivelmente impediu a produção de NO pelos macrófagos. Entretanto, a RTB02 também reduziu a expressão de TGF- β e IL-10, mesmo assim não houve a produção de NO. Nos tratamentos com RTB62 ocorreu aumento na expressão de TGF- β e para TNF- α e IL-10 não houve diferença significativa em relação ao controle infectado não tratado. Nesse caso, mesmo a alta

expressão de TGF- β não foi capaz de produzir NO. Esses dados reforçam a indicação de que as duas benzoiltioureias estejam atuando no mecanismo de morte direta, preferencialmente por apoptose, sobre as formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e não por indução da síntese de moléculas citotóxicas e mediadoras do sistema imune.

6. CONCLUSÃO E PERSPECTIVA

As benzoiltioureias são capazes de eliminar todas as formas evolutivas de *T. cruzi* através da ação direta sobre o parasito. De acordo com o mecanismo de ação de ambas as substâncias, a morte celular das formas epimastigotas foram causadas por apoptose, assim como, para as formas amastigotas intracelulares que não dependeram da ativação de vias de morte dos macrófagos. RTB62 apresentou melhores atividades tripanocidas contra as três diferentes formas evolutivas do parasito.

Como perspectiva, novos estudos posteriores devem ser realizados para avaliar o perfil de citocinas e outras moléculas envolvidas na imunomodulação. Além de outras investigações sobre o mecanismo de ação e de morte das substâncias sobre o protozoário flagelado. Benzoiltioureias mostraram resultados promissores no combate aos parasitos causadores da doença. Demonstrando grande potencial para o desenvolvimento de possíveis substâncias sintéticas antimicrobianas com estruturas químicas formadas por átomos de tiourea. É possivelmente para o desenvolvimento de fármacos com melhor atividade e menos efeitos colaterais aos pacientes portadores da doença de Chagas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; BARBOSA, T. P.; NÉRIS, P. L. N.; CALDAS, J. P. A.; SOUSA, S. C. O.; OLIVEIRA, M. R. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v. 140, n. 1, p. 29-38, 2012.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas disease: new global challenges for an old neglected disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

BARRIAS, E. S.; REIGNAULT, L. C.; DE SOUZA, W.; CARVALHO, T. M. U. Dynasore, a dynamin inhibitor, inhibits *Trypanosoma cruzi* entry into peritoneal macrophages. **PLoS One**, v. 5, n. 1, p. 7764, 2010.

BERN, C. Chagas' disease. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456–466, 2015.

BRITO, T. O.; ABREU, L. O.; GOMES, K. M.; LOURENÇO, M. C. S.; PEREIRA, P. M. L.; YAMADA-OGATTA, S. F.; BISPO, M. L. F. Benzoylthioureas: Design, Synthesis and Antimycobacterial Evaluation. **Medicinal chemistry (Sharjah (United Arab Emirates))**, 2018.

CAMARGO, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*-I. Origin of metacyclic Trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93–100, 1964.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29-37, 2002.

DE SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. M. U.; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: host cell interaction. **International journal of cell biology**, v. 2010, 2010.

FRANCISCO, A. F.; JAYAWARDHANA, S.; LEWIS, M. D.; TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. Biological factors that impinge on Chagas disease drug development. **Parasitology**, v. 144, n. 14, p. 1871-1880, 2017.

FIELD, M. C.; HORN, D.; FAIRLAMB, A. H.; FERGUSON, M. A.; GRAY, D. W.; READ, K. D.; GILBERT, I. H. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 217, 2017.

GERGELY, P.; NILAND, B.; GONCHOROFF, N.; PULLMANN, R.; PHILLIPS, P. E.; PERL, A. Persistent mitochondrial hyperpolarization, increased reactive oxygen intermediate production, and cytoplasmic alkalinization characterize altered IL-10 signaling in patients with systemic lupus erythematosus. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 1092-1101, 2002.

HIDEKO TATAKIHARA, V. L.; CECCHINI, R.; BORGES, C. L.; MALVEZI, A. D.; GRAÇA-DE SOUZA, V. K.; YAMADA-OGATTA, S. F.; PINGE-FILHO, P. Effects of cyclooxygenase inhibitors on parasite burden, anemia and oxidative stress in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 47–58, 2008.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; VEIGA JR, V. F.; PINTO, A. C.; NAKAMURA, C. V. Terpenes from *Copaifera* demonstrated in vitro antiparasitic and synergic activity. **Journal of medicinal chemistry**, v. 55, n. 7, p. 2994-3001, 2012.

JOSHI, D. C.; BAKOWSKA, J. C. Determination of mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species in live rat cortical neurons. **Journal of visualized experiments: JoVE**, n. 51, 2011.

KACZANOWSKI, S.; SAJID, M.; REECE, S. E. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. **Parasites & vectors**, v. 4, n. 1, p. 44, 2011.

KANG, J.; PERVAIZ, S. Mitochondria: redox metabolism and dysfunction. **Biochemistry research international**, v. 2012, 2012.

KIAN, D.; LANCHEROS, C. A. C.; ASSOLINI, J. P.; ARAKAWA, N. S.; VEIGA-JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V.; YAMAUCHI, L. M. Trypanocidal activity of copaiba oil and kaurenoic acid does not depend on macrophage killing machinery. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1294-1301, 2018.

LANCHEROS, C. A. C.; PELEGRINO, M. T.; KIAN, D.; TAVARES, E. R.; HIRAIWA, P. M.; GOLDENBERG, S.; YAMADA-OGATTA, S. F. Selective antiprotozoal activity of nitric oxide-releasing chitosan nanoparticles against *Trypanosoma cruzi*: toxicity and mechanisms of action. **Current pharmaceutical design**, v. 24, n. 7, p. 830-839, 2018.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; MARTINS, S. C.; RIBEIRO, F. M.; DIN, Z. U.; RODRIGUES-FILHO, E.; DE OLIVEIRA SILVA, S. Dibenzylideneacetones are potent trypanocidal compounds that affect the *Trypanosoma cruzi* redox system. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 890-903, 2016.

MADDANI, M. R.; PRABHU, K. R. A concise synthesis of substituted thiourea derivatives in aqueous medium. **The Journal of organic chemistry**, v. 75, n. 7, p. 2327-2332, 2010.

MARTINS, S. C.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; FALZIROLLI, H.; DA SILVA, C. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. 1, 3, 4-Thiadiazole derivatives of R-(+)-limonene benzaldehyde-thiosemicarbazones cause death in *Trypanosoma cruzi* through oxidative stress. **Microbes and infection**, v. 18, n. 12, p. 787-797, 2016.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; CORRÊA, J. R.; CASCABULHO, C. M.; FERNANDES, M. C.; PINTO, A. V.; SOARES, M. J.; DE CASTRO, S. L. Naphthoimidazoles promote different death phenotypes in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 136, n. 5, p. 499-510, 2009.

MOHAMED, N. A.; EL-GHANY, N. A. A.; FAHMY, M. M. Novel antimicrobial superporous cross-linked chitosan/pyromellitimide benzoyl thiourea hydrogels. **International journal of biological macromolecules**, v. 82, p. 589-598, 2016.

OKIMOTO, Y.; WATANABE, A.; NIKI, E.; YAMASHITA, T.; NOGUCHI, N. A novel fluorescent probe diphenyl-1-pyrenylphosphine to follow lipid peroxidation in cell membranes. **FEBS letters**, v. 474, n. 2-3, p. 137-140, 2000.

PAIVA, M. J. B. de. Estudos de Síntese e Relação Estrutura-Atividade (SAR) de Novas Benziltioureas Derivadas do Isotiocianato de Benzila (BITC) com Atividade Larvicida frente a *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

PITA, S. S. R.; PASCUTTI, P. G. Alvos terapêuticos na doença de Chagas: a tripanotona redutase como foco. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 4, p. 307-324, 2011.

RAJÃO, M. A.; FURTADO, C.; ALVES, C. L.; PASSOS-SILVA, D. G.; DE MOURA, M. B.; SCHAMBER-REIS, B. L.; MENDES, I. C. 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.

RAUF, M. K.; TALIB, A.; BADSHAH, A.; ZAIB, S.; SHOAIK, K.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Solution-phase microwave assisted parallel synthesis of N, N'-disubstituted thioureas derived from benzoic acid: Biological evaluation and molecular docking studies. **European journal of medicinal chemistry**, v. 70, p. 487-496, 2013.

SAEED, A.; KHAN, M. S.; RAFIQUE, H.; SHAHID, M.; IQBAL, J. Design, synthesis, molecular docking studies and in vitro screening of ethyl 4-(3-benzoylthioureido) benzoates as urease inhibitors. **Bioorganic chemistry**, v. 52, p. 1-7, 2014.

SALES JUNIOR, P. A. S.; MOLINA, I.; MURTA, S. M. F.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; SALVADOR, F.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; CARNEIRO, C. M. Experimental and clinical treatment of Chagas disease: a review. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1289-1303, 2017.

SALOMON, C. J. First century of chagas' disease: An overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 101, n. 3, p. 888-894, 2012.

SILVA, L. H. P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clinica Biologica**, v. 20, p. 197-207, 1953.

STEFANELLO, T. F.; PANICE, M. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; SARRAGIOTTO, M. H.; AUZÉLY-VELTY, R.; NAKAMURA, C. V. N-Butyl-[1-(4-methoxy) phenyl-9H- β -carboline]-3-carboxamide prevents cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7112-7120, 2014.

SHUKLA, A. K.; PATRA, S.; DUBEY, V. K. Iridoid glucosides from *Nyctanthes arborescens* result in increased reactive oxygen species and cellular redox homeostasis imbalance in *Leishmania* parasite. **European journal of medicinal chemistry**, v. 54, p. 49-58, 2012.

VAMECQ, J.; DESSEIN, A. F.; FONTAINE, M.; BRIAND, G.; PORCHET, N.; LATRUFFE, N.; CHERKAOUI-MALKI, M. Mitochondrial dysfunction and lipid homeostasis. **Current drug metabolism**, v. 13, n. 10, p. 1388-1400, 2012.

VANDEN BERGHE, T.; VANLANGENAKKER, N.; PARTHOENS, E.; DECKERS, W.; DEVOS, M.; FESTJENS, N.; VANDENABEELE, P. Necroptosis, necrosis and secondary necrosis converge on similar cellular disintegration features. **Cell death and differentiation**, v. 17, n. 6, p. 922, 2010.

VILA-DEL SOL, V.; DÍAZ-MUÑOZ, M. D.; FRESNO, M. Requirement of tumor necrosis factor α and nuclear factor- κ B in the induction by IFN- γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 272-283, 2007.

WHO, World Health Organization. **Chagas disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>>, 2018.

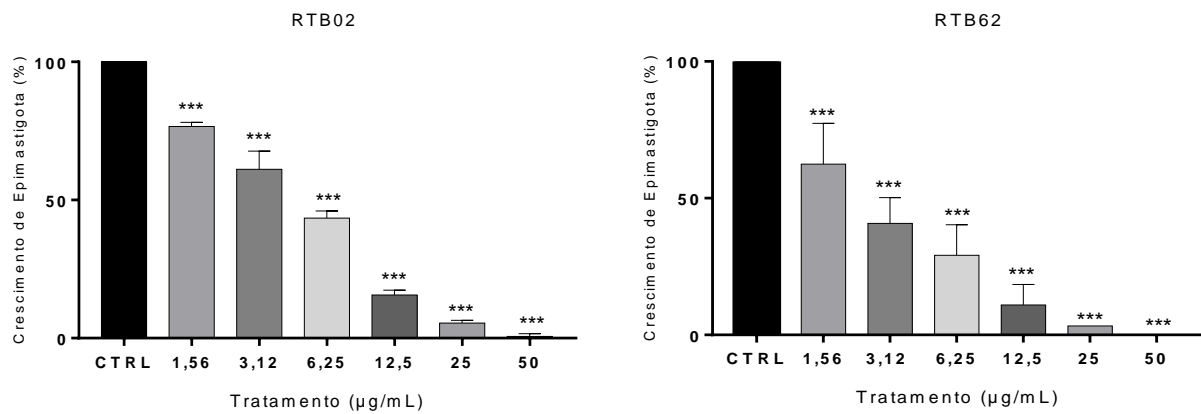


Figura 2. Benzoiltiureias RTB02 (A) e RTB62 (B) inibem o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Epimastigotas foram tratados com concentrações crescentes (1,56 a 50 µg/mL) por 72 h a 28°C. Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao grupo controle – CTRL (parasitos não tratados) ***p < 0,001.

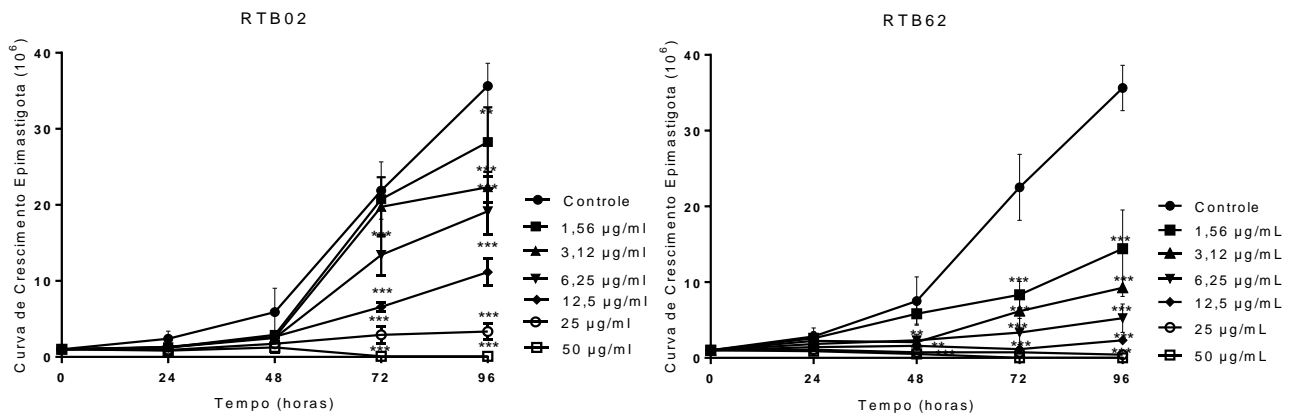


Figura 3. Curva de crescimento de epimastigotas tratados com RTB02 (A) e RTB62 (B). Epimastigotas foram tratados com concentrações crescentes (1,56 a 50 µg/mL) a 28°C. As contagens foram realizadas em intervalos de 24h por 4 dias. Parasitos sem tratamento foram utilizados como controle (CTRL). Asteriscos indicam diferenças significativas com relação ao grupo controle *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

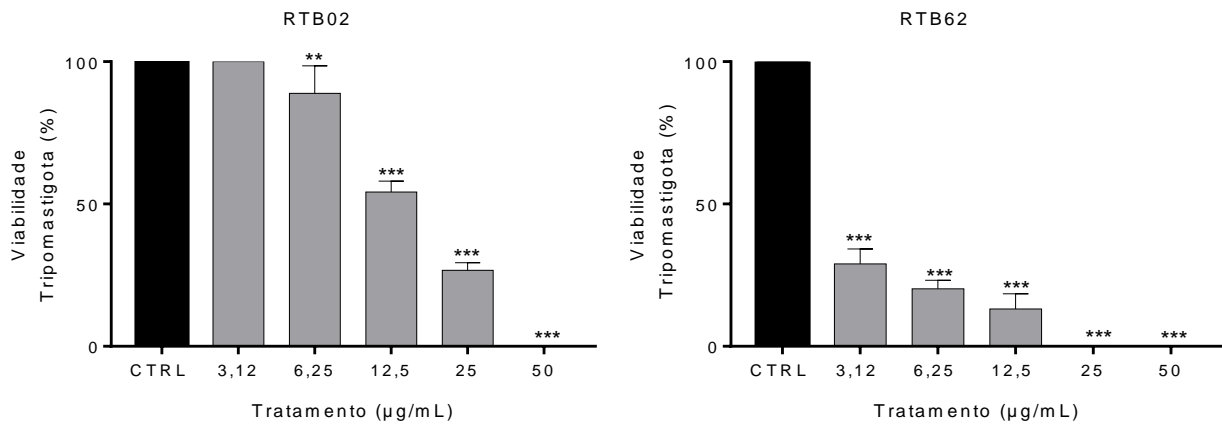


Figura 4. Benzoiltiureias RTB02 (A) e RTB62 (B) inibem a viabilidade de formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Tripomastigotas foram tratados com concentrações crescentes (3,12 a 50 µg/mL) por 24 h a 37°C. **p < 0,01, *** p < 0,001 indicam diferenças significativas com relação ao grupo controle – CTRL (parasitos não tratados).

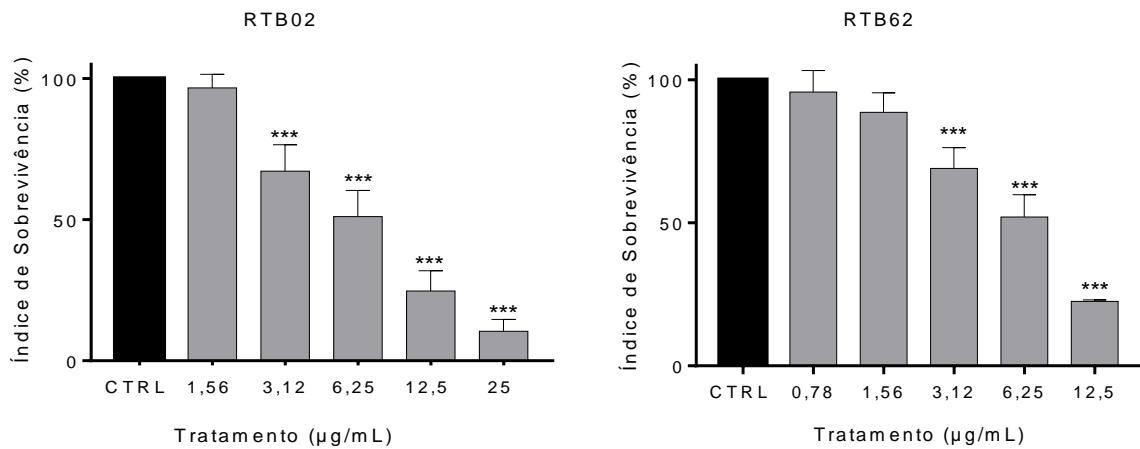


Figura 5. Benzoiltiureias RTB02 (A) e RTB62 (B) inibem a proliferação das formas amastigotas de *T. cruzi*. As células aderentes do exsudato peritoneal infectadas com as formas amastigotas foram tratadas com concentrações (1,56 a 25 µg/mL) RTB02 e (0,78 a 12,5 µg/mL) RTB62 por 48 h a 37°C. *** $p < 0,001$ indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle – CTRL (células não tratadas).

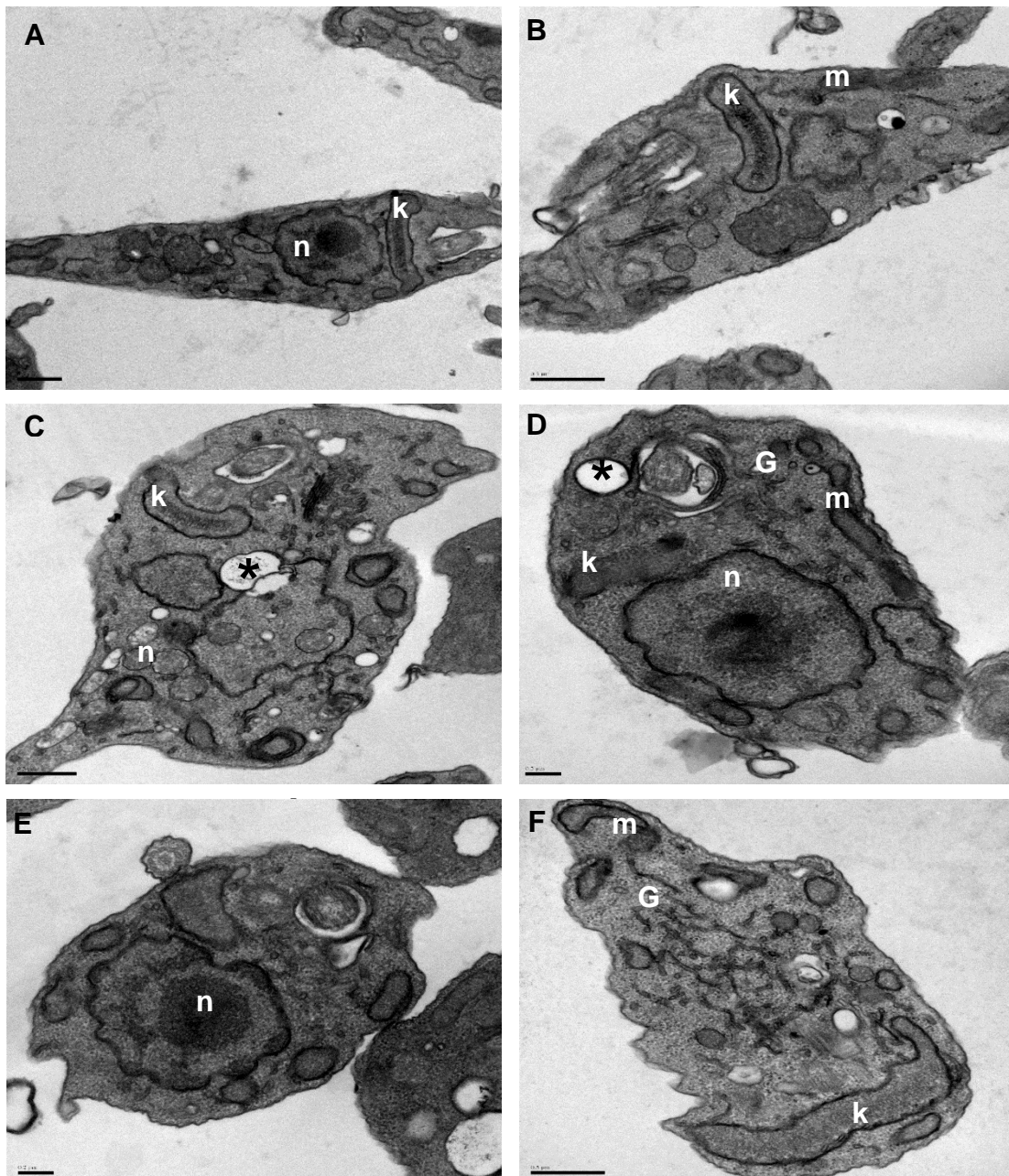


Figura 6. Alterações Ultraestruturais em formas epimastigotas de *T. cruzi* tratados com as Benzoilthioureas. Os parasitos foram tratados com concentrações referentes a inibição de 50 e 90% do crescimento (IC_{50} 5,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IC_{90} 21,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) RTB02, (IC_{50} 0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IC_{90} 9,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$) RTB62 por 72h a 28°C. Controle de parasitos sem tratamento exibiram organelas com morforlogia normal (A e B), epimastigotas tratados com IC_{50} da RTB02 (C), IC_{90} RTB02 (D), IC_{50} RTB62 (E), IC_{90} RTB62 (F). Núcleo (n), mitocôndria (m), kinetoplasto (K), Complexo de Golgi desorganizado (G) alterações nos vacúolos (asteriscos pretos). Barras: A, B, C e F: 0,5 μm ; D e E: 0,2 μm

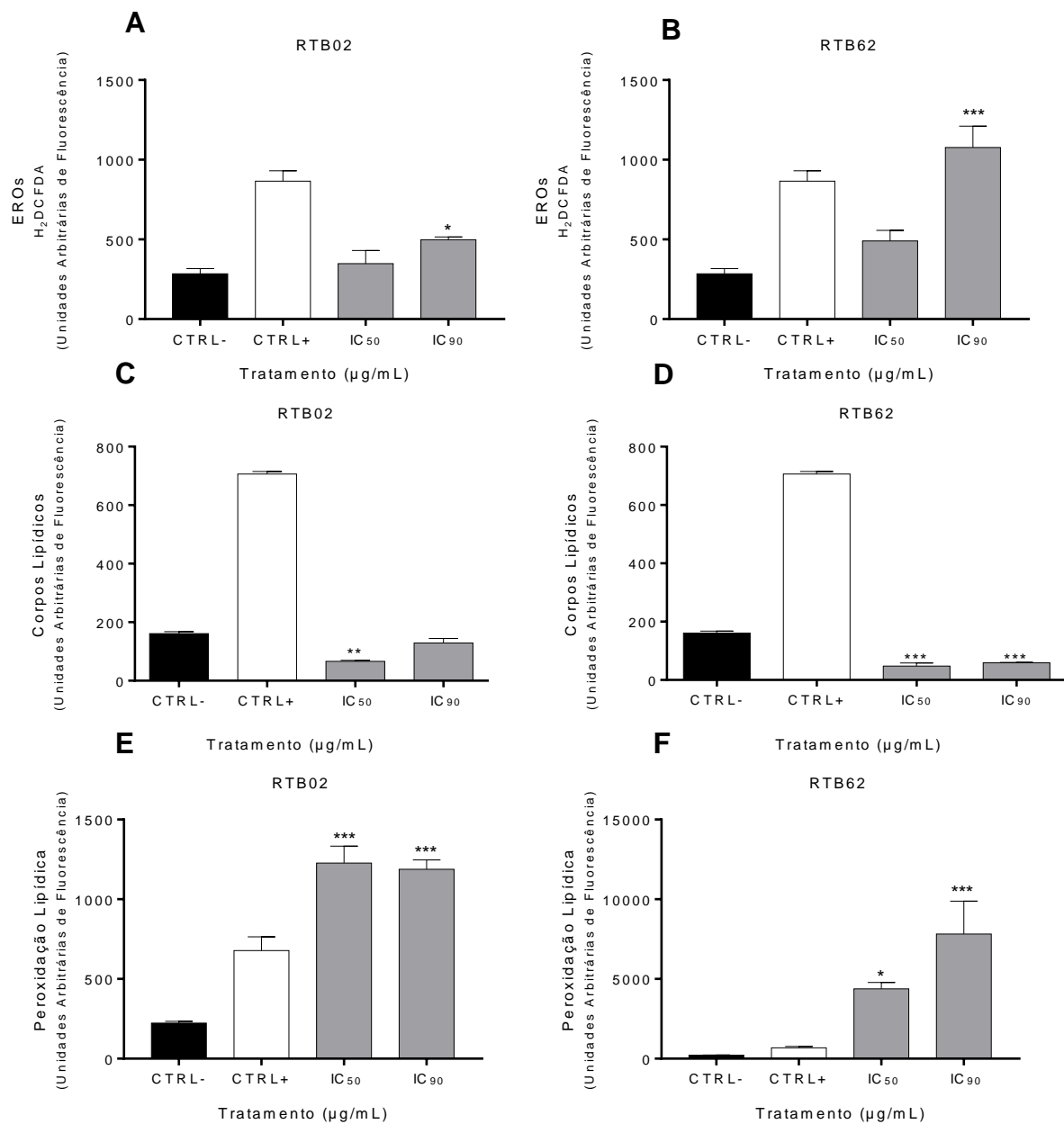


Figura 7. Mecanismo de ação das benzotiazoleias RTB02 e RTB62 sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram tratados com concentrações referentes a inibição de 50% e 90% do crescimento (IC₅₀ 5,71 µg/mL e IC₉₀ 21,41 µg/mL) RTB02, (IC₅₀ 0,98 µg/mL e IC₉₀ 9,37µg/mL) RTB62 por 72h a 28°C. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (A e B), corpos lipídicos (C e D), peroxidação lipídica (E e F). Como controle positivo (CTRL+) foi utilizado peróxido de hidrogênio (H₂O₂). *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle não tratado (CTRL-).

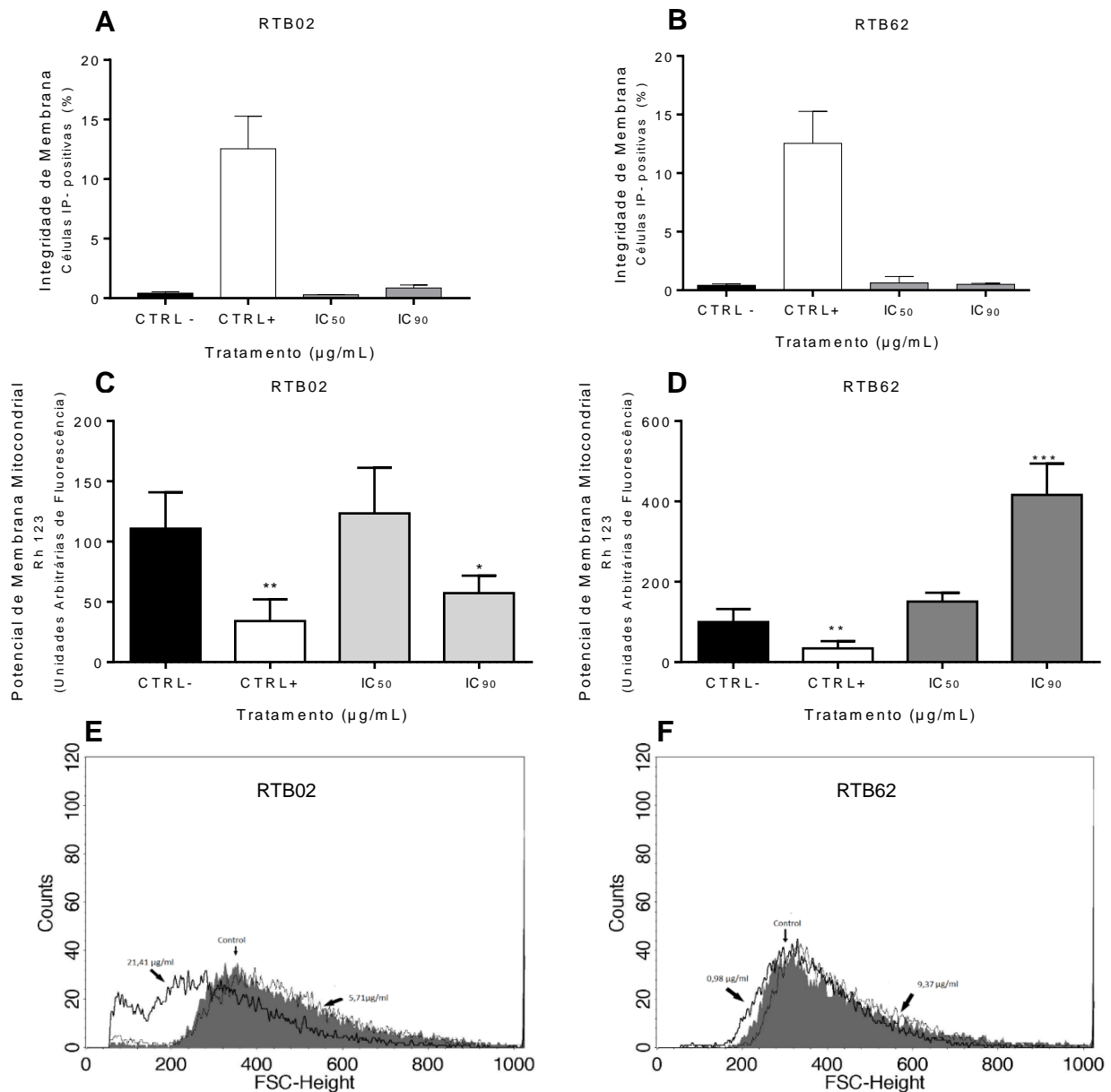


Figura 8. Mecanismo de ação das benzoiltioureas RTB02 e RTB62 sobre as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram tratados com concentrações referentes a inibição de 50 e 90% do crescimento (IC_{50} 5,71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IC_{90} 21,41 $\mu\text{g}/\text{mL}$) RTB02, (IC_{50} 0,98 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e IC_{90} 9,37 $\mu\text{g}/\text{mL}$) RTB62 por 72h a 28°C. Integridade de membrana celular (A e B), potencial de membrana mitocondrial (C e D) e volume celular (E e F). Setas correspondem as concentrações testadas. Para o grupo controle foram utilizados parasitos sem tratamento (CTRL-). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, indicam diferenças significativas em relação ao grupo controle.

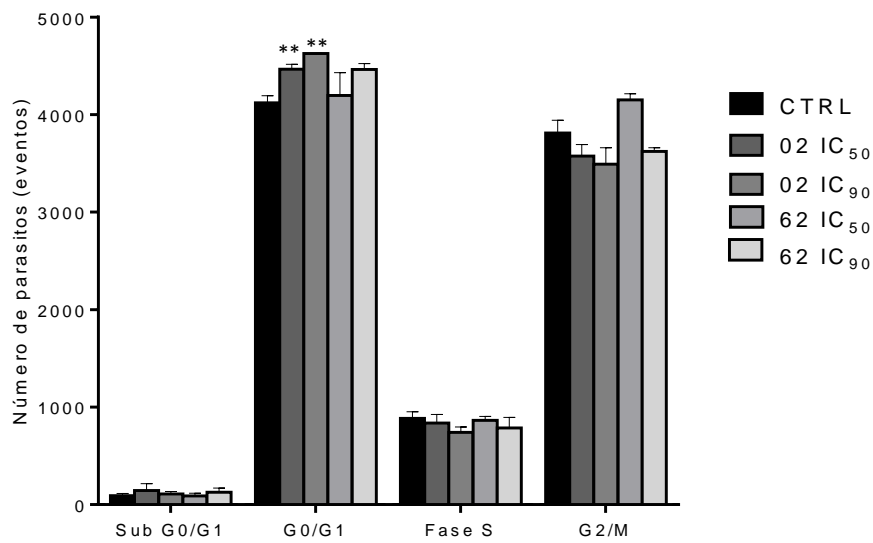


Figura 9. Benzoiltiureia RTB02 alteram o ciclo celular na fase G0/G1 das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitos foram tratados com concentrações referentes a inibição de 50% e 90% do crescimento (IC₅₀ 5,71 µg/mL e IC₉₀ 21,41 µg/mL) RTB02, (IC₅₀ 0,98 µg/mL e IC₉₀ 9,37 µg/mL) RTB62 por 24h a 28°C. Para o grupo controle foram utilizados parasitos sem tratamento (CTRL-). **p < 0,01 indica diferenças significativas em relação ao grupo controle.

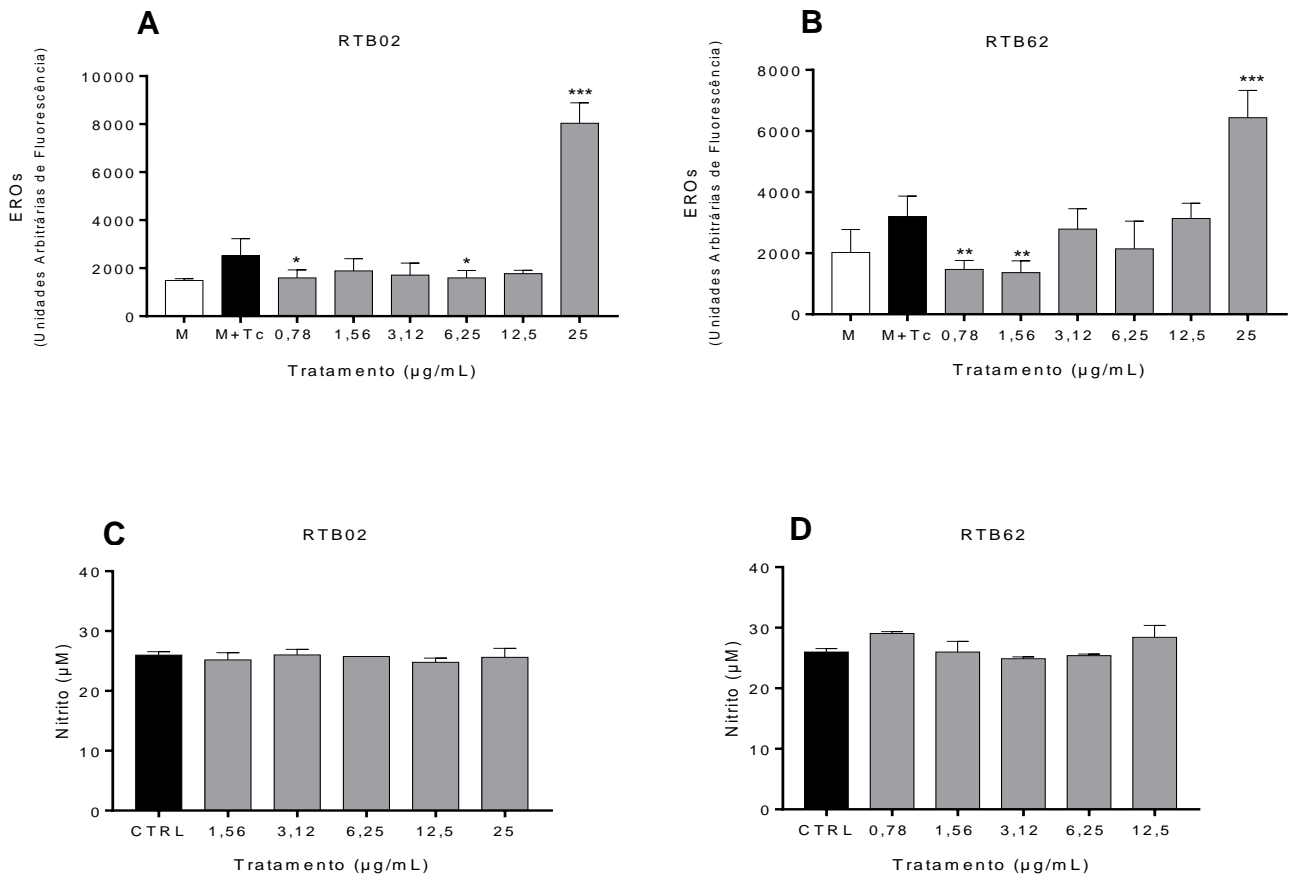


Figura 10. Benzoiltioureas RTB02 (A) e RTB62 (B) não aumentam a produção de EROs nem de NO (C e D) em células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi*. As células foram tratadas com concentrações crescentes (0,78 a 25 µg/ml). M+Tc (macrófago infectado não tratado), M (macrófago sem infecção e sem tratamento). CTRL (Grupo controle não tratado). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ indicam diferenças significativas comparados ao grupo controle.

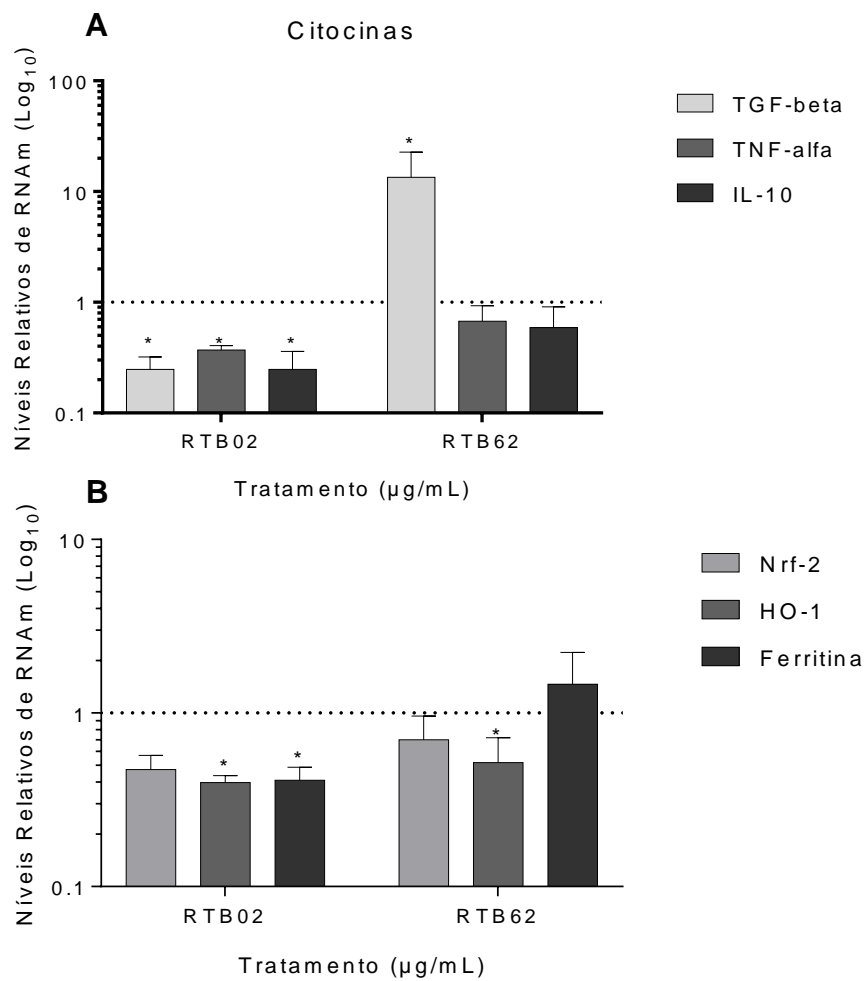


Figura 11. Benzoiltioureia RTB02 diminui os níveis de expressão gênica de TGF- β , TNF- α e IL-10 (A) e HO-1 e Ferritina (B) e RTB62 aumenta a expressão de TGF- β (A) e diminui HO-1 (B) em células aderentes do exsudato peritoneal infectadas por *T. cruzi* (A). As células foram tratadas por 48h com concentrações referentes a inibição de 50% do crescimento das formas amastigotas, RTB02 (6,50 µg/mL) e RTB62 (6,85 µg/mL). Os resultados da expressão gênica relativa produzidas pelas células infectadas e tratadas com as benzoiltioureias foram comparadas ao grupo de células infectadas não tratadas (linha tracejada). * $p < 0,05$ indica diferenças significativas com relação ao grupo controle.

Resumo Gráfico

