

CAPÍTULO 4

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO TRATAMENTO DE CAMUNDONGOS BALB/c COM BENZOILTIOURÉIA Tp: PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E FISIOLÓGICOS

Data de aceite: 02/05/2024

Lucas Felipe dos Santos

Departamento de Microbiologia,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

Mateus de Oliveira Rodrigues Viana

Departamento de Microbiologia,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

Raquel Pires Nakama

Departamento de Imunologia,
Parasitologia e Patologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

Leonardo Berto Pereira

Departamento de Imunologia,
Parasitologia e Patologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

Lucas Sobral de Rossi

Departamento de Imunologia,
Parasitologia e Patologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

Ana Paula Canizares Cardoso

Departamento de Imunologia,
Parasitologia e Patologia Geral,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

Priscila Goes Camargo

Departamento de Química, Universidade
Estadual de Londrina, PR – Brasil

Marina Luiza da Silva

Departamento de Química, Universidade
Estadual de Londrina, PR – Brasil

Giovanna Machado Benetti

Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva, Universidade Estadual de
Londrina, PR – Brasil

Karina Keller Marques da Costa Flaiban

Departamento de Medicina Veterinária
Preventiva, Universidade Estadual de
Londrina, PR – Brasil

Eliandro Reis Tavares

Departamento de Microbiologia,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

Marcelle de Lima Ferreira Bispo

Departamento de Química, Universidade
Estadual de Londrina, PR – Brasil

Sueli Fumie Yamada-Ogatta

Departamento de Microbiologia,
Universidade Estadual de Londrina, PR –
Brasil

RESUMO: A doença de Chagas (DC), causada por *Trypanosoma cruzi*, representa grandes desafios devido à limitada eficácia das intervenções terapêuticas existentes. Novos fármacos para tratar DC são necessários. Com isso, há uma busca contínua por novas alternativas que possam servir para o tratamento da DC, sendo eficazes contra o parasito sem causar toxicidade pelo uso a longo prazo. As benzoiltiouréias (BTU) são moléculas modificadas que têm demonstrado efeitos tripanocidas em ensaios *in vitro*, inibindo a propagação de formas tripomastigotas do *T. cruzi*, e têm se mostrado seguras por não induzirem ações tumorigênicas ou mutagênicas. O objetivo deste trabalho foi caracterizar parâmetros bioquímicos (enzimas hepáticas e renais) e fisiológicos (massa corporal e dos órgãos; fígado e rins) em modelo murino após o tratamento com diferentes concentrações de benzoiltiouréias 1p (BTU-1p). Camundongos BALB/c machos foram tratados (via gavagem) com BTU-1p (12,5, 25,0 e 50,0 mg/kg) durante 30 dias (controles receberam água; DMSO 2% - veículo). Enzimas hepáticas e renais, assim como a massa corporal, do fígado e dos rins, foram avaliadas. A quantificação de ALT, AST, gama GT, fosfatase alcalina, ureia, massa corporal, do fígado e dos rins apresentou resultados negativos para toxicidade. Satisfatoriamente, demonstramos que a BTU 1p, quanto à sua toxicidade, é uma candidata para testes *in vivo* frente à DC, podendo ser uma alternativa para o tratamento em monoterapia ou em terapia combinada.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Chagas, Alternativa terapêutica, Benzoiltiouréia 1p, Dose-resposta.

TOXICOLOGICAL EVALUATION OF TREATMENT OF BALB/c MICE WITH BENZOILTHIOUREA 1p: BIOCHEMICAL AND PHYSIOLOGICAL PARAMETERS

ABSTRACT: Chagas disease (CD), caused by *Trypanosoma cruzi*, represents significant challenges due to the limited efficacy of existing therapeutic interventions. New drugs to treat CD are necessary. As such, there is a continuous search for new alternatives that can be effective against the parasite without causing long-term toxicity. Benzoiltiouréias (BTU) are modified molecules that have demonstrated trypanocidal effects in *in vitro* assays, inhibiting the propagation of *T. cruzi* tripomastigote forms, and have proven to be safe by not inducing tumorigenic or mutagenic actions. The aim of this study was to characterize biochemical parameters (hepatic and renal enzymes) and physiological parameters (body mass and organ mass; liver and kidneys) in a murine model after treatment with different concentrations of benzoiltiouréias 1p (BTU-1p). Male BALB/c mice were treated (via gavage) with BTU-1p (12.5, 25.0, and 50.0 mg/kg) for 30 days (controls received water; 2% DMSO - vehicle). Hepatic and renal enzymes, as well as body mass, liver mass, and kidney mass, were evaluated. The quantification of ALT, AST, gamma GT, alkaline phosphatase, urea, body mass, liver mass, and kidney mass showed negative results for toxicity. We have satisfactorily demonstrated that BTU 1p, concerning its toxicity, is a candidate for *in vivo* tests against CD, being a potential alternative for monotherapy or combined therapy.

KEYWORDS: Chagas disease, Therapeutic alternative, Benzoylthiourea 1p, Dose-response.

INTRODUÇÃO

A Doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (1). Como estratégia terapêutica há disponibilidade de dois medicamentos no Brasil: Benznidazol e Nifurtimox. No entanto, ambos possuem efeitos adversos proeminentes e são pouco eficazes na fase crônica da doença, o que culmina em ampla desistência do tratamento pelos pacientes, resultando na progressão da doença (2-4). Portanto, há uma necessidade crítica de medicamentos novos, seguros e eficazes para o tratamento da DC (5). Benzoiltiouréias (BTUs) são derivados de tiouréia que apresentaram respostas biológicas auspiciosas em testes *in vitro* com *T. cruzi*. Após docking molecular, estima-se que a BTU 1p interage com as enzimas cruzaina por ligações de hidrogênio ou se coordenam com o ferro do grupo heme da C14-alfaesteroidesmetilase (CYP51), através do oxigênio do grupamento carbonila. Como resultado da interação, pode-se haver inibição da replicação e/ou mortalidade do parasito (6). Outrossim, há necessidade de testes *in vivo* para avaliar sua segurança em modelo animal.

OBJETIVOS

Caracterizar parâmetros bioquímicos (enzimas hepáticas e renais) e fisiológicos (massa corporal e dos órgãos; fígado e rins) em modelo murino após o tratamento com diferentes concentrações de benzoiltiouréias 1p.

METODOLOGIA

Para o ensaio dose-resposta foram utilizados camundongos BALB/c machos com idade de 8 a 12 semanas (n = 7). Protocolos aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UEL (CEUA 023.2022). Os camundongos foram tratados com as concentrações de 12,5, 25,0 e 50,0 mg/kg/animal durante 30 dias via gavagem (100 μ L/dia). Grupos de animais controles receberam água autoclavada em mesmo volume ou dimetilsulfóxido (DMSO) a 2% (veículo).

Parâmetros bioquímicos

No dia 31^o após o tratamento, foi realizada a coleta de sangue por punção cardíaca. Os níveis ALT, AST, GGT, FA e ureia foram quantificados partir do soro utilizando-se os kits comerciais e um analisador bioquímico por quimioluminescência da *Dimension RxL Max* (Siemens Munique, Alemanha) conforme protocolo do fabricante.

Avaliação de massa corporal

Para avaliar a massa corporal, os animais dos diferentes grupos controles e experimental foram pesados nos dias 7, 15 e 30. No 31º dia, os animais foram submetidos à eutanásia, e a coleta de rins e fígado foi realizada para a mensuração da massa corporal.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). A significância foi avaliada por ANOVA One-way ou Two-way, seguida pelo teste de múltiplas comparações de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas os resultados com $p \leq 0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.0 (GraphPad Software, San Diego, CA).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação de enzimas hepáticas e renais é importante para a segurança farmacológica. Dessa maneira, avaliamos a alanina aminotransferase (ALT), a aspartato aminotransferase (AST), a gama glutamiltransferase (GGT), a fosfatase alcalina (FA) e a ureia (Fig. 1A - E). Nossos resultados demonstram que o tratamento com benzoiltiuréias 1p em diferentes concentrações não alterou as enzimas ALT e AST (Fig. 1A e 1B) quando comparamos os animais tratados com os animais dos grupos controles ($p \geq 0,05$). Essas enzimas (ALT e AST) são importantes marcadores de extravasamento hepático sérico, sendo medidas no sangue periférico. Esse extravasamento pode ser ocasionado por lesão hepatocelular ou alterações na permeabilidade da membrana de hepatócitos, que podem ser geradas pela intoxicação medicamentosa. Esse conjunto de medidas fornece de forma precisa a magnitude e extensão de possíveis lesões no fígado, além de apontar o desempenho adequado deste órgão (7).

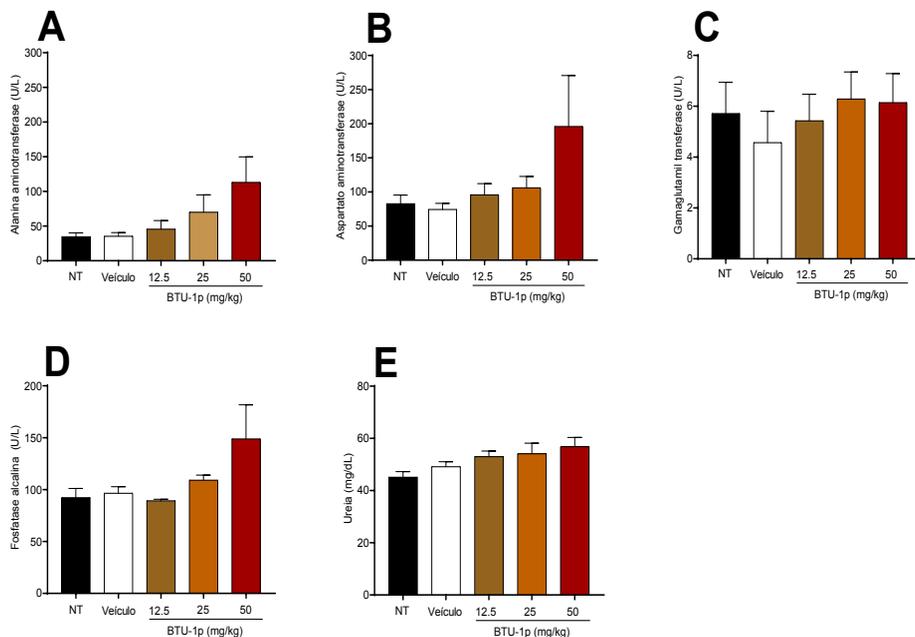


Figura 1. Níveis sorológicos de enzimas hepáticas e renais. O monitoramento dos níveis sorológicos de ALT (A) e AST (B) GGT (C), FA (D) e ureia (E) foram utilizados como indicativo de dano renal e hepático. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão (SEM). Os dados foram submetidos ao ANOVA One-way seguido pelo pós-teste de Tukey, com $p \geq 0,05$.

Nossos resultados demonstram que o tratamento com benzoiltiouréias em diferentes concentrações não alteraram as enzimas GGT e FA (**Fig. 1C e 1D**) quando comparamos os animais tratados com os animais do grupo controle ($p > 0,05$). A dosagem de GGT e FA são fundamentais na análise hepática já que detecta a colestase hepática, que consiste na diminuição ou interrupção do fluxo biliar.

A ureia é um metabólito produzido via ciclo da ornitina, através da amônia circulante. Baixos níveis indicam que a conversão de amônia em ureia está deficiente, sendo um sinalizador de deficiência hepática e renal. Em adição mostramos que o tratamento com benzoiltiouréias 1p em diferentes concentrações não alteraram os níveis de ureia (**Fig. 1E**) quando comparamos os animais dos grupos controles ($p \geq 0,05$). De maneira satisfatória, nossos resultados asseguram que as doses testadas (12,5, 25,0 e 50,0 mg/Kg) não produzem dano tecidual ou celular hepático, bem como, não interferem no funcionamento renal.

Visando compreender os efeitos fisiológicos do tratamento com BTU 1p, analisamos a massa corporal total, a massa dos rins e do fígado. Nossos resultados demonstram que o tratamento com BTU 1p em diferentes concentrações não alterou a massa corporal total ou dos órgãos (**Fig. 2A, 2B e 2C**) quando comparamos os animais tratados com os animais do grupo controle ($p \geq 0,05$).

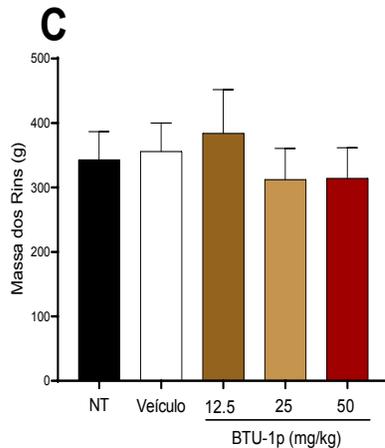
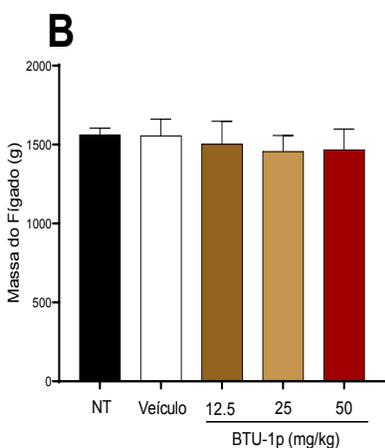
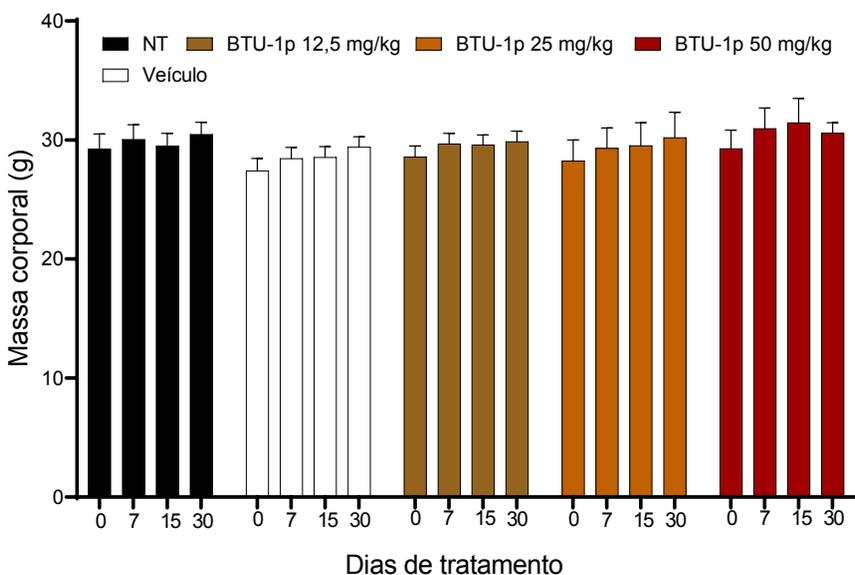


Figura 2. Avaliação da massa corporal total e de órgãos. Massa corporal total (A), massa do fígado (B) e massa dos rins (C). A avaliação da massa foi utilizada como parâmetro fisiológicos para alterações metabólicas sistêmicas ou localizadas. Os resultados foram expressos com média \pm erro padrão (SEM). Os dados foram submetidos ao ANOVA One-way ou Two-way seguido pelo pós-teste de Tukey, com $p \geq 0.05$.

Dessa forma, demonstramos que as doses testadas de BTU 1p (com efeitos tripanocidas comprovados), não foram capazes de induzir alterações metabólicas relacionadas à massa corporal ou aos órgãos avaliados. Em suma, os parâmetros fisiológicos indicam a manutenção da homeostase durante o período de exposição ao fármaco, caracterizada pela preservação renal, hepática e corporal dos animais.

CONCLUSÕES

A doença de Chagas carece de aperfeiçoamento quimioterápico como medida fundamental para evitar o abandono do tratamento pelos pacientes. Nossos resultados em modelo animal são pioneiros ao analisar a toxicidade de benzoiltioureas em murinos. Com isso, demonstramos que a BTU 1p foi capaz de preservar o bom funcionamento hepático e renal em todas as concentrações testadas, em comparação com o grupo de controle. Além disso, nossos resultados fisiológicos indicam que o composto não alterou o metabolismo energético dos murinos durante o período de tratamento. Considerando a intrínseca necessidade de novos medicamentos para a DC, este é um marco de grande relevância. Concluímos, portanto, que a BTU 1p, quanto à sua toxicidade, é uma candidata para testes *in vivo* frente à DC, podendo ser uma alternativa ao tratamento em monoterapia ou em terapia combinada.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e à Fundação Araucária. Ao Governo do Estado do Paraná, Conselho Paranaense de Ciência e Tecnologia, e Secretaria de Estado da Ciência, Tecnologia, e Ensino Superior (SETI) - dotação orçamentária # 4560.19.571.06.6153; protocolo 21.234.745-0. CNPq, Bolsa produtividade, pesquisador Phileno Pinge Filho, processo 304114/2022-7.

REFERÊNCIAS

- (1) Steverding D. The history of Chagas disease. *Parasites & vectors*. 2014;7:317.
- (2) Pérez-Molina JA, Crespillo-Andújar C, Bosch-Nicolau P, Molina I. Trypanocidal treatment of Chagas disease. *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed)*. 2021;39(9):458-70.
- (3) Apt W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. *Drug design, development and therapy*. 2010;4:243-53.
- (4) Rodrigues Coura J, de Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2002;97(1):3-24.
- (5) Chatelain E, Konar N. Translational challenges of animal models in Chagas disease drug development: a review. *Drug design, development and therapy*. 2015;9:4807-23.
- (6) Pereira PML, Camargo PG, Fernandes BT, Flores-Junior LAP, Dias LRS, Lima CHS, et al. In vitro evaluation of antitrypanosomal activity and molecular docking of benzoylthioureas. *Parasitology international*. 2021;80:102225.
- (7) Ramaiah SK. A toxicologist guide to the diagnostic interpretation of hepatic biochemical parameters. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*. 2007;45(9):1551-7.