

AVALIAÇÃO HISTOPATOLOGICA DE CAMUNDONGOS INOCULADOS POR VIA ORAL E INTRAPERITONEAL COM *Trypanosoma cruzi* E TRATADOS COM BENZONIDAZOL

Ingrid Giarola Matias dos Santos (PIBIC/CNPq), Alice Maria de Souza Kaneshima, Hevillyn Fernanda Lucas da Silva (co-orientador), Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador), e-mail: mjtoledo@uem.br

¹ Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Ciências Biológicas, Parasitologia, Protozoologia de Parasitos

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, benzonidazol, análise histopatológica.

Resumo

Na doença de Chagas (DC), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, o miocárdio é o principal alvo do parasito, entretanto, lesões no fígado também estão relacionadas à fase aguda da infecção. O benzonidazol (BZ), medicamento utilizado no tratamento da DC, causa reações adversas importantes podendo induzir toxicidade hepática. **Objetivo:** Realizar avaliação histopatológica de camundongos inoculados por via oral (VO) e intraperitoneal (IP) com *T. cruzi* e tratados com BZ na fase aguda da infecção. **Material e métodos:** Camundongos Swiss machos de ~20 dias, inoculados por VO e IP com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura da cepa Y de *T. cruzi* (TcII), assim como os animais controles não infectados, tratados ou não com BZ, foram submetidos à eutanásia e tiveram o coração e fígado analisados microscopicamente após coloração pela hematoxilina-eosina. **Resultados e Discussão:** Foi observado processo inflamatório em ambos os tecidos, cardíaco e hepático, nos animais do grupo sem infecção, tratados com BZ (NI+BZ), sugerindo toxicidade do fármaco, especialmente no fígado onde ele é metabolizado. No tecido cardíaco dos animais infectados, observou-se infiltrado inflamatório, necrose, fibrose e congestão vascular, principalmente nos infectados por via IP que apresentaram maior letalidade. O tratamento com BZ promoveu redução das lesões dos animais inoculados por VO.

Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado, agente etiológico da doença de Chagas (DC), cuja forma de transmissão mais frequente é a via oral (ingestão de alimentos contaminados). Nos hospedeiros vertebrados, a infecção apresenta duas fases distintas. A fase aguda, caracterizada pela presença de parasitos na corrente sanguínea e também parasitismo tecidual em diferentes órgãos (TARLETON & ZHANG, 1999). Nos pacientes não tratados, a doença evolui para a fase crônica, ocorrendo redução do parasitismo com pequenos ninhos de amastigotas e lesão tecidual em órgãos específicos, podendo apresentar processo inflamatório e fibrose de graus variados (VERA-CRUZ et al., 2003). No Brasil, o medicamento usado no tratamento da DC é o benzonidazol (BZ) que promove a cura parasitológica em até 80% dos pacientes na fase aguda. Contudo, ele apresenta alta toxicidade e não garante a cura após dispersão do parasito nos tecidos do hospedeiro, apresentando

baixa eficácia na fase crônica (RASSI-JR et al., 2010). Baseado nessas informações, nos propusemos avaliar as alterações histopatológicas em camundongos inoculados pela via oral e intraperitoneal com uma cepa *T. cruzi* II e tratados com BZ durante a fase aguda da infecção.

Materiais e métodos

Aspectos éticos: O uso, manutenção e cuidados com os camundongos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da UEM (parecer número 9659251017/2017).

Parasitas e animais: Foram utilizados 60 camundongos Swiss, machos, de ~21 dias, provenientes do Biotério Central da UEM. Vinte animais foram inoculados por via oral (VO) e 20 por via intraperitoneal (IP), com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura da cepa Y de *T. cruzi* (TcII) em 1,0 mL de meio LIT. Os 20 animais restantes, não foram inoculados e serviram como controles não infectados.

Grupos experimentais: Seis grupos de 10 animais cada: 1) Controle não infectado e não tratado (CNI); 2) Controle não infectado e tratado (NI+BZ); 3) Infectado por VO e não tratado (VONT); 4) Infectado por VO e tratado (VO+BZ); 5) Infectado por via IP e não tratado (IPNT); e 6) Infectado por via IP e tratado (IP+BZ).

Tratamento etiológico: Consistiu na administração da dose de 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ) (LAFEPE®, Pernambuco, Brasil) por gavagem, durante 20 dias consecutivos, iniciando-se o tratamento no 5º dia de infecção (d.i.).

Avaliações histopatológicas: Foram avaliados 3-5 animais por grupo experimental os quais foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico para a coleta do coração e fígado. Fragmentos destes órgãos foram fixados em formalina 10% e, após 24 h, preservados em álcool 70%. Após desidratação e diafanização, os tecidos foram embebidos em parafina, cortados em seções de 5 µm de espessura, separadas por intervalos de 25 µm, montadas em lâminas de vidro e coradas com hematoxilina-eosina, para serem examinadas em microscópio óptico (objetiva de 40x). Foram avaliadas as seguintes alterações histopatológicas: parasitismo tecidual, processo inflamatório (PI), necrose, fibrose, hemorragia e congestão do vaso sanguíneo.

Análises estatísticas: Foi utilizado o teste Exato de Fisher do *software* Bioestat 5.3 (Belém, Pará, Brasil) nas comparações dois a dois entre os grupos experimentais, considerando significativos valores de $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

Para se verificar qual via de inoculação era mais patogênica, foram comparados os grupos não tratados VONT e IPNT. Entretanto, devido à alta taxa de mortalidade dos animais inoculados por via IP, apenas 2 animais deste grupo foram analisados, não sendo observada diferença entre os grupos (Tabela 1). O grupo VONT, por sua vez, apresentou diferenças em relação ao grupo CNI em 3/6 parâmetros (PI, necrose e fibrose), indicando a elevada patogenicidade da via oral para o tecido cardíaco (Figura 1b).

Para se verificar se o tratamento sozinho seria capaz de causar lesão tecidual, o grupo CNI foi comparado ao grupo NI+BZ. Neste último grupo, o número de animais que apresentaram PI no coração foi maior ($p = 0,008$) que no grupo CNI, sugerindo cardiotoxicidade do medicamento (Tabela 1).

O efeito do tratamento com BZ nas alterações histopatológicas foi analisado comparando-se os animais inoculados, tanto por VO quanto por via IP, e tratados, com os respectivos controles não tratados (VONT x VO+BZ e IPNT x IP+BZ). Para os animais VO, o BZ promoveu redução ($p = 0,015$) no número de animais com necrose no coração, mostrando benefício do tratamento (Tabela 1). Naqueles inoculados por via IP, todos os animais tratados (IP+BZ) e não tratados (IPNT) apresentaram alterações histopatológicas, com exceção do parasitismo tecidual (PT) que não foi registrado para nenhum animal. Entretanto, não foram observadas diferenças entre eles para nenhuma das alterações avaliadas (Tabela 1). Mais uma vez isso pode ter ocorrido devido ao baixo número de animais sobreviventes do grupo IPNT ($n = 2$), impedindo a comparação estatística e sugerindo maior letalidade da cepa Y (TcII) para animais inoculados por via IP em comparação aos inoculados por VO. Este dado sugere ainda que a patogenicidade de *T. cruzi* para camundongos depende tanto da via de inoculação quanto da cepa (ou DTU).

Tabela 1. Alterações histopatológicas no tecido cardíaco de camundongos inoculados por via oral (VO) e intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (TcII), tratados com benzonidazol (BZ 100 mg/kg/dia, 20X), controles não infectados e não tratados (CNI) e tratados (NI+BZ).

Alterações	Grupos experimentais					
	Nº de animais com alteração / Total de animais analisados (%)					
	CNI	NI+BZ	VONT	VO+BZ	IPNT	IP+BZ
PT ^a	0/4 (0.0)	0/5 (0.0)	0/6 (0.0)	0/5 (0.0)	0/2 (0.0)	0/4 (0.0)
PI ^b	0/4 (0.0) [*] #	5/5 (100.0) [*]	6/6 (100.0) [#]	5/5 (100.0)	2/2 (100.0)	4/4 (100.0)
Necrose	0/4 (0.0) [#]	0/5 (0.0)	5/6 (83.3) [*] #	0/5 (0.0) [*]	2/2 (100.0)	4/4 (100.0)
Fibrose	0/4 (0.0) [#]	3/5 (60.0)	6/6 (100.0) [#]	5/5 (100.0)	2/2 (100.0)	4/4 (100.0)
Hemorragia	4/4 (100.0)	5/5 (100.0)	6/6 (100.0)	5/5 (100.0)	2/2 (100.0)	4/4 (100.0)
CV ^c	4/4 (100.0)	5/5 (100.0)	6/6 (100.0)	4/5 (80.0)	2/2 (100.0)	4/4 (100.0)
%Mor ^d	0/10 (0.0)	1/10 (10.0)	6/10 (60.0)	3/10 (30.0)	8/10 (80.0)	6/10 (60.0)

^a Parasitismo tecidual; ^b processo inflamatório; ^c congestão vascular; e ^d taxa de mortalidade. Valores com símbolos iguais na mesma linha são significativamente diferentes ($p \leq 0,05$).

No tecido hepático, mesmo com a alta taxa de mortalidade dos animais IPNT (80%), foi possível observar diferença para necrose ($p = 0,048$) quando comparados aos animais VONT (Dados não mostrados), sugerindo maior patogenicidade da via IP para o fígado. Entretanto, a VO ainda apresentou patogenicidade quando comparada ao grupo CNI, com diferença significativa ($p = 0,048$) em 2/6 parâmetros (PI e fibrose).

Assim como foi observado no tecido cardíaco, o fármaco foi capaz de causar lesões no fígado, sendo observadas diferenças para PI e hemorragia ($p = 0,008$ e $p = 0,048$, respectivamente) na comparação entre NI+BZ e CNI. Este achado corrobora com o aumento das dosagens bioquímicas das enzimas hepáticas (ALT e AST), sugerindo dano no tecido hepático provocado pelo BZ (Lucas da Silva 2019). O tratamento com BZ promoveu redução no número de animais com congestão vascular hepática ($p = 0,015$) (Figura 1c), somente para a VO (Dados não mostrados).

Não foi observado PT (ninhos de amastigotas) em nenhum dos dois órgãos analisados. Esse resultado pode ser explicado pelo dia em que os animais foram submetidos à eutanásia, em torno de 45 d.i. Em camundongos inoculados com a cepa Y de *T. cruzi*, este dia já é considerado da fase crônica, quando são escassos os ninhos amastigotas nos tecidos.

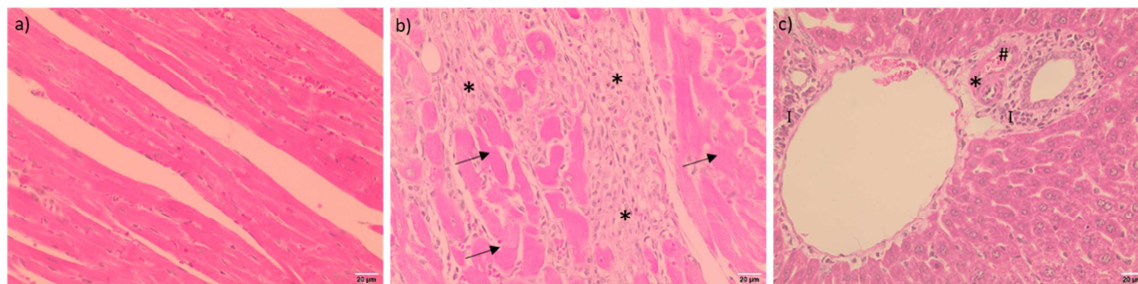


Figura 1. Camundongos Swiss inoculados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (TcII) e não tratados. a) Tecido cardíaco de animal sem infecção. b) Tecido cardíaco de camundongo infectado por via intraperitoneal. c) Tecido hepático de camundongo infectado via oral. * fibrose; → necrose; # congestão vascular; e I: infiltrado inflamatório.

Conclusões

As avaliações histopatológicas do coração e do fígado de camundongos infectados com a cepa Y de *T. cruzi* II mostraram que tanto a infecção quanto o BZ causam lesões teciduais. A via oral foi capaz de causar lesões tanto no tecido cardíaco quanto no hepático. Entretanto, não foi possível verificar qual via foi mais patogênica devido à alta taxa de mortalidade apresentada pelos animais inoculados via IP, que se mostrou mais virulenta. A severidade das lesões encontradas no tecido hepático, principalmente dos animais NI+BZ, corrobora com o aumento das enzimas AST e ALT, indicativas de lesões hepáticas. Por fim, o tratamento com BZ trouxe benefícios reduzindo a necrose (no coração) e congestão vascular (no fígado) dos animais inoculados por VO.

Agradecimentos

À Fundação Araucária (10943812,251//2014) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (483469/2013-0) pelo apoio financeiro.

Referências

LUCAS DA SILVA, H. F. Avaliações parasitológicas e bioquímicas de camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com benzonidazol. Dissertação de mestrado. Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde. Universidade Estadual de Maringá. 2019.

RASSI JUNIOR, A; RASSI, A; MARIN-NETO, JA. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p.1388-1402, abr. 2010.

TARLETON, RL; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitology Today**, v. 15, n.3, p. 94-8, 1999.

VERA-CRUZ, JM et al. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. **Parasitology Research**, v. 89, n. 6, p.480-486, abr. 2003.