

## EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DO BENZONIDAZOL COM O ÁCIDO ASCÓRBICO E MENADIONA NA INFECÇÃO CRÔNICA MURINA COM A CEPA COLOMBIANA DE *Trypanosoma cruzi*

Marcelo Eduardo Cardozo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Marcella Paula Mansano Sarto, Danielle Lazarin Bidóia, Celso Vataru Nakamura, Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager, Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador), e-mail: [mjotoledo@uem.br](mailto:mjotoledo@uem.br)

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

**Ciências Biológicas, Parasitologia, Protozoologia de Parasitos**

**Palavras-chave:** Doença de Chagas, camundongos, associação de fármacos.

### Resumo

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* que afeta milhões de pessoas no mundo. Os medicamentos disponíveis para o seu tratamento apresentam eficácia limitada e efeitos colaterais significativos. Devido a esses fatores, a busca por opções terapêuticas mais eficazes se faz necessária. O objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos da associação do benzonidazol (BZ) com o ácido ascórbico (AA) e menadiona (ME) em camundongos inoculados por via intraperitoneal com a cepa colombiana de *T. cruzi*, resistente a droga, durante a fase crônica da infecção. Os animais foram divididos em 5 grupos: 1) Não infectado e não tratado; 2) Infectado e não tratado; 3) Infectado e tratado com BZ 100 mg / kg / dia; 4) Infectado e tratado com AA 200 mg e ME 3,5 mg / kg / dia; 5) Infectado e tratado com a associação de BZ 5 mg + AA 200 mg e ME 3,5 mg / kg / dia. Os tratamentos se iniciaram no 60º dia após a inoculação, durante 20 dias consecutivos. Na avaliação desses grupos foram realizados exame de sangue a fresco, imunossupressão com ciclofosfamida e PCR em tempo real. Embora os três tratamentos não tenham resultado em cura parasitológica, promoveram redução significativa da carga parasitária no sangue, músculos cardíaco e esquelético. Maior redução foi registrada para a associação AA + ME / BZ 5 mg, indicando benefícios para os animais tratados. Há necessidade de maiores investigações sobre esta associação como uma possível alternativa ao tratamento etiológico da doença de Chagas.

### Introdução

A doença de Chagas (DC), é uma doença parasitária cujo agente etiológico é o protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*. Está presente no mundo todo, atingindo cerca de 7 milhões de pessoas (WHO 2021).

Estudos *in vitro* evidenciaram a eficácia da associação entre benzonidazol (BZ), ácido ascórbico (vitamina C) e menadiona (vitamina K3) contra o *T. cruzi*, possibilitando o desenvolvimento de um tratamento que apresente maior efeito tripanocida em relação às opções atualmente disponíveis (DESOTI et al. 2015).

Dessa forma, buscamos avaliar os efeitos da associação do BZ com ácido ascórbico (AA) e menadiona (ME) em modelo experimental murino da DC crônica infectado com a cepa colombiana de *T. cruzi*.

## Materiais e Métodos

O uso de animais seguiu as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CNECA), parecer nº 5439130720.

Foram utilizados camundongos Balb/C machos, com idade entre 21 e 28 dias, provenientes do Biotério Central da UEM e inoculados por via intraperitoneal (IP) com 500 tripomastigotas sanguíneos da cepa colombiana de *T. cruzi* (considerada resistente ao BZ e nifurtimox).

Os camundongos foram divididos nos seguintes grupos experimentais (n = 13): 1) Não infectado e não tratado (NI); 2) Infectado e não tratado (NT); 3) Infectado e tratado com BZ 100 mg / kg / dia; 4) Infectado e tratado com AA (vitamina C) 200 mg / kg / dia e ME (vitamina K3) 3,5 mg / kg / dia; 5) Infectado e tratado com a associação de BZ 5 mg + AA 200 mg / kg / dia e ME 3,5 mg / kg / dia. Os medicamentos foram administrados diariamente por gavagem, durante 20 dias consecutivos, a partir de 60 dias após inoculação (dpi).

A partir de 3 dpi, os níveis de parasitemia foram verificados diariamente em cada animal, até negatização por três dias consecutivos (BRENER 1962). A fase crônica da DC foi definida como a ausência de parasitemia aos 60 dpi.

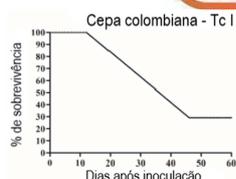
As coletas de sangue e tecidos (coração e musculo esquelético) foram feitas após eutanásia no 119º dpi. A extração do DNA foi realizada utilizando o Mini Kit PureLink® Genomic DNA (Invitrogen®) e a qPCR foi realizada por meio do sistema LightCycler® 480 (Roche Diagnostics Brussels, Bélgica).

Aos 80 dpi, os animais de todos os grupos experimentais foram submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida (Cy) (50 mg / kg / dia) administrada por via IP em cinco ciclos. A cura foi determinada de acordo com os resultados do exame de sangue fresco, feito antes e após a imunossupressão, e da qPCR. Os animais que apresentaram resultado positivo em qualquer um destes testes foram considerados não curados. A taxa de sobrevivência foi avaliada pelo gráfico de Kaplan-Meier.

Os dados foram analisados usando uma ou duas vias de análise de variância (ANOVA). Diferenças significativas entre as médias foram identificadas pelo teste *post hoc* de Tukey ou Bonferroni. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

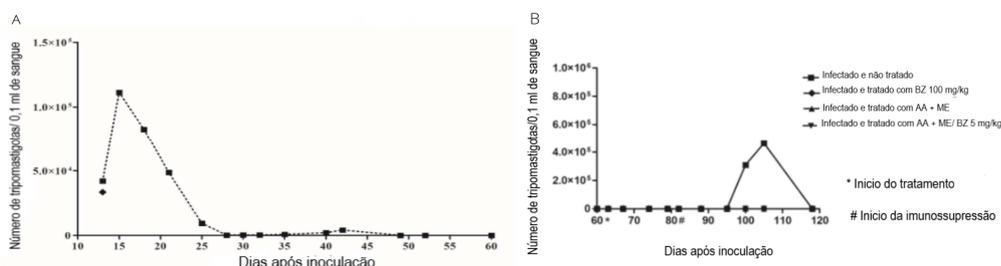
## Resultados e Discussão

Para acompanhar a infecção até a fase crônica da doença, foram analisadas amostras de sangue fresco coletadas diariamente de cada animal. Aos 60 dpi, nenhum parasita foi observado no sangue dos animais infectados, indicando a fase crônica da infecção experimental da DC. Antes do início do tratamento, a taxa de mortalidade dos animais era de 69,2% (Fig. 01). Nesse ponto, o tratamento foi iniciado por 20 dias consecutivos (Fig. 02).



**Figura 01** - Curva de Kaplan-Meier com taxa de sobrevivência de camundongos Balb/C infectados por via intraperitoneal com cepa colombiana de *T. cruzi*, até o início do tratamento aos 60 dias.

A partir da análise dos gráficos com as curvas de parasitemia média pode-se observar que os animais infectados com a cepa colombiana apresentaram pico máximo maior que  $1,0 \times 10^5$  tripomastigotas sanguíneos (TS) / 0,1 mL de sangue e dia de pico máximo em torno dos 15 dpi (Fig. 02-A). Os animais do grupo NT apresentaram parasitemia patente durante o período da imunossupressão, com pico máximo próximo de  $6,0 \times 10^5$  TS / 0,1 mL de sangue e dia do pico máximo de parasitemia em torno dos 105 dpi (Fig. 02-B).

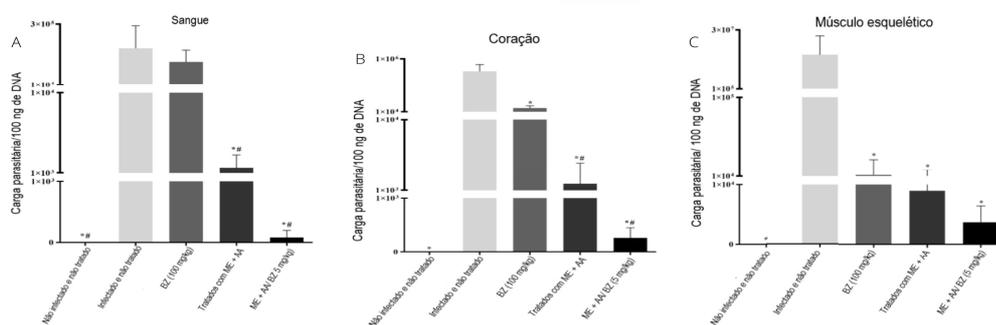


**Figura 02** - Curvas de parasitemia média dos camundongos Balb/C infectados por via intraperitoneal com a cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi* antes dos tratamentos (A), durante e após os tratamentos etiológicos e com ciclofosfamida (B).

Para detectar o DNA de *T. cruzi* e quantificar a carga parasitária (CP) nos animais dos diferentes grupos, foi realizada a qPCR com amostras de sangue e de tecidos do coração e músculo esquelético (Fig. 03).

Nos três tipos de amostras, o teste evidenciou maior redução da CP ( $p \leq 0.0001$ ) nos animais tratados com a combinação de ME + AA / BZ em baixa dose (5 mg / kg / dia) em relação ao grupo infectado e não tratado (NT), e no sangue e coração em relação ao tratamento com o medicamento de referência (BZ 100 mg / kg / dia) (Fig. 03). O grupo tratado com AA + ME teve uma redução significativa ( $p \leq 0.0001$ ) da CP no sangue e tecido cardíaco em comparação tanto com os animais NT quanto com os tratados com BZ (100 mg / kg / dia) isoladamente (Fig. 03 - A e B). O grupo tratado com a combinação de AA + ME / BZ em dose baixa (5 mg / kg / dia) eliminou quase que completamente os parasitos do sangue (Fig. 03-A).

Entretanto, resultados da qPCR evidenciaram falha terapêutica para todos os tratamentos avaliados, pois devido a sua alta sensibilidade, esta técnica foi capaz de detectar valores tão baixos quanto 200 fg de DNA em todos os animais tratados, os quais apresentaram taxa de cura de 0,0% sendo, portanto, considerados parasitologicamente não curados (Fig. 03).



**Figura 03** - Carga parasitária do sangue (A), coração (B) e músculo esquelético (C) de camundongos Balb/C não infectados e não tratados (NI), infectados por via intraperitoneal com a cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi* e não tratados (NT), tratados com benzonidazol (BZ 100 mg / kg / dia), com menadiona (ME 200 mg / kg / dia) e ácido ascórbico (AA 3,5 mg / kg / dia), e com ME+AA / BZ (5 mg / kg / dia). Resultados expressos como média  $\pm$  desvio padrão. \* indica diferença significativa comparado com o grupo NT ( $p \leq 0.0001$ ). # indica diferença significativa comparado com o grupo tratado com BZ 100 mg ( $p \leq 0.0001$ ).

## Conclusões

Os resultados do presente estudo denotam que embora os tratamentos avaliados tenham promovido a supressão da carga parasitária, não resultaram em cura parasitológica dos animais infectados, como evidenciado principalmente pela técnica de qPCR. Contudo, como a combinação de medicamentos (AA+ME/BZ) promoveu maior redução na carga parasitária dos diferentes tecidos analisados, em relação tanto aos animais controles não tratados quanto aos demais tratamentos, são necessárias maiores investigações sobre o uso dessa associação como um potencial tratamento alternativo para a doença de Chagas.

## Agradecimentos

CNPq; Capes; Fundação Araucária e Universidade Estadual de Maringá.

## Referências

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** 4: 389-396, 1962.

DESOTI, V. C. *et al.* The combination of vitamin K<sub>3</sub> and vitamin C has synergic activity against forms of *Trypanosoma cruzi* through a redox imbalance process. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e0144033, 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. World Health Organization, 2021.