

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

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

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

Área: Ciências Biológicas e Subárea: Parasitologia, Protozoologia de Parasitos

Palavras-chave: doença de Chagas, infecção oral, patogenicidade

Resumo

Na doença de Chagas, a miocardite é a principal alteração patológica causada pelo *Trypanosoma cruzi*. No entanto, lesões no fígado também podem ocorrer na fase aguda da infecção. Atualmente, a forma de transmissão mais frequente é por via oral (VO) e no seu tratamento utiliza-se o benzonidazol (BZ), que tem efeitos colaterais e baixa eficácia na fase crônica. Nosso objetivo foi realizar avaliação histopatológica de camundongos inoculados por VO e intraperitoneal (IP) com *T. cruzi* IV (TcIV) e tratados com BZ durante a fase aguda. Camundongos machos de ~21 dias, foram inoculados por VO e IP com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos (TM) da cepa AM14 de TcIV, distribuídos nos seguintes grupos: não infectado e tratado com BZ (NI+BZ), infectados e tratados (VO+BZ e IP+BZ) e controles não tratados (VONT e IPNT), e submetidos a análises da parasitemia e histopatológica (após eutanásia e coloração por HE). A infecção por VO se mostrou mais virulenta que a infecção por via IP, com níveis de parasitemia mais elevados e presença de parasitismo tecidual no coração. Processos inflamatórios (PI), variando de moderado a intenso, foram observados tanto no tecido cardíaco quanto no fígado dos animais NI+BZ, indicando toxicidade do fármaco. PI intenso foi observado tanto nos animais controles (VONT e IPNT) quanto nos tratados (VO+BZ e IP+BZ), indicando ausência de resposta ao tratamento. A infecção com formas TM da cepa AM14 (TcIV) por VO foi mais virulenta que por via IP, embora os parâmetros de patogenicidade não tenham apresentado diferenças entre as vias de inoculação.

Introdução

A doença de Chagas (DC) é considerada uma doença tropical e negligenciada. Atualmente, uma das formas mais frequentes de transmissão de *T. cruzi* é pela via oral (VO), correspondendo a cerca de 80% das novas

infecções. As cepas de *T. cruzi* são classificadas em seis unidades de tipagem distintas (DTU, do inglês *discrete typing units*), de TcI a TcVI, e podem apresentar características biológicas e distribuição geográfica diferentes. Nos hospedeiros vertebrados, a infecção apresenta duas fases distintas. A fase aguda, caracterizada pela presença de parasitos na corrente sanguínea e parasitismo tecidual em diferentes órgãos. E a fase crônica, caracterizada pela redução do número de parasitos na corrente sanguínea e lesão tecidual em órgãos específicos, essencialmente no coração, causando miocardite, fibrose e disfunção cardíaca (BRASIL, 2019). Atualmente, o tratamento etiológico da DC no Brasil, é feito utilizando-se o benzonidazol (BZ) que promove uma cura parasitológica de até 80% em pacientes na fase aguda. Entretanto, o fármaco pode causar reações adversas e não garante a cura após dispersão do parasito em órgãos e tecidos, apresentando baixa eficácia na fase crônica da infecção. Baseado nessas informações, o objetivo do estudo foi avaliar as alterações histopatológicas em camundongos inoculados pela VO e intraperitoneal (IP) com uma cepa *T. cruzi* IV e tratados com BZ durante a fase aguda da infecção.

Materiais e Métodos

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (UEM) aprovou os procedimentos utilizados no estudo atual (Parecer número 9659251017/2017). Foram utilizados 56 camundongos Swiss, machos, de ~21 dias, provenientes do Biotério Central da UEM. Vinte animais foram inoculados por VO e 20 por via IP, com o inóculo de 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura (TMC) em 1,0 ml de meio LIT (DIAS et al., 2013). Os 16 animais restantes não foram infectados e foram utilizados como controles. Os animais foram distribuídos em seis grupos: Controle não infectado e não tratado (CNI), controle não infectado e tratado (NI+BZ), infectados por VO e não tratados (VONT), infectados por VO e tratados (VO+BZ), infectados por via IP e não tratados (IPNT), e infectados por via IP e tratados (IP+BZ). O 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.). Foi realizado exame de sangue a fresco em todos os animais inoculados antes, durante e após o tratamento com BZ para se confirmar a infecção e traçar a curva de parasitemia. Três a cinco animais por grupo foram submetidos à eutanásia por aprofundamento anestésico com administração por via IP da associação ketamina (Fagra®, Rhobipharma, Brasil) (50 mg/kg) e xilazina (Anasedan, CEVA, Brasil) (10 mg/kg). As coletas do coração e fígado foram realizadas em três momentos distintos durante o período de infecção: a primeira coleta (dois animais por grupo) foi realizada no dia do pico máximo de parasitemia que, para os animais inoculados por via IP, ocorreu no 7º d.i., e para os inoculados por VO, no 10º d.i.; a segunda coleta (dois animais por grupo) ocorreu no 28º d.i., ao fim do tratamento com BZ; e a terceira coleta dos demais animais

ocorreu no 47º d.i., no início da fase crônica, após a imunossupressão com ciclofosfamida (Cy). Foram avaliadas a presença e intensidade do parasitismo tecidual e do processo inflamatório (PI), que foi classificado como ausente (-), leve (+, 1 foco/secção), moderado (++, 2-5 focos/secção) e intenso (+++, >5 focos/secção). 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 os valores de $p \leq 0,05$.

Resultados e Discussão

A infecção de camundongos *Swiss* com a cepa AM14 (TcIV) por VO apresentou maior virulência que a infecção por via IP, traduzindo-se em um período patente mais longo e níveis de parasitemia mais elevados (Figura 1a). Formas amastigotas foram observadas apenas no tecido cardíaco, em um dos camundongos do grupo VONT, analisado no pico da parasitemia (10 d.i.) (Figura 1b), concordando com Gruending et al. (2015) que observaram parasitismo tecidual, principalmente no coração e cérebro, de camundongos inoculados com cepas TcIV, incluindo a AM14. Os tecidos cardíacos e hepáticos dos animais controles não tratados inoculados pelas duas vias (VO e IP) apresentaram inflamação intensa e focal (Figura 1c) sem diferença significativa entre os grupos, independentemente do dia de infecção. PI nos animais não infectados e tratados com BZ (NI+BZ) variou de moderado a intenso, tanto no coração ($p = 0,0002$) quanto no fígado ($p = 0,0008$), em comparação ao grupo CNI, confirmando os resultados das análises bioquímicas, onde foi mostrado que a droga sozinha afeta o fígado, causando um aumento da atividade das enzimas AST e ALT (LUCAS DA SILVA, 2019).

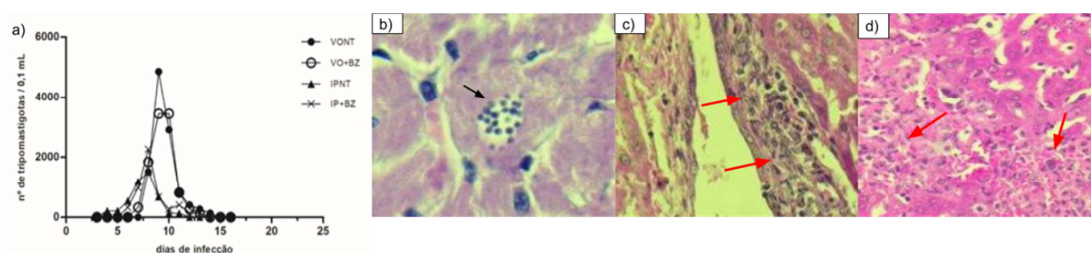


Figura 1 - a) Curvas de parasitemia média em camundongos inoculados por via oral (VO) e por via intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura da cepa AM14 (TcIV) de *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol (BZ) (100 mg/kg/dia, 20X), a partir do 5º dia de infecção, e em controles não tratados (NT). Fotomicrografias: b) Tecido cardíaco de camundongo infectado VO e NT, mostrando ninho de amastigotas (seta preta); c) Tecido hepático de camundongo infectado VO e NT com processo inflamatório focal e intenso; e d) Tecido hepático de camundongo infectado via IP e tratado com BZ. Aumento de 40X, escala 200 μ m. Infiltrado inflamatório (seta vermelha).

Os animais dos grupos VO+BZ e IP+BZ também apresentaram PI intenso e focal indicando que o tratamento com BZ não foi efetivo para atenuar estas lesões no fígado (Figura 1d) e no coração dos animais tratados,

corroborando com Teston et al. (2021) que consideraram a cepa AM14 resistente ao tratamento com BZ na infecção com o mesmo inóculo, tanto por VO quanto por via IP.

Conclusões

A infecção de camundongos com a cepa AM14 (TcIV) de *T. cruzi* se mostrou mais virulenta quando adquirida pela VO em comparação à via IP, apresentando níveis de parasitemia mais elevados e formas amastigotas no coração durante o pico de parasitemia. O BZ sozinho foi capaz de causar lesões inflamatórias moderadas e intensas no tecido cardíaco e hepático dos animais não infectados, sugerindo toxicidade do fármaco. O PI foi intenso e focal no coração e fígado dos animais infectados por ambas as vias, mesmo nos grupos tratados com BZ, sugerindo ausência de resposta ao tratamento.

Agradecimentos

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

Referências

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016., v. 50, Nº 02, jan. 2019. Acesso em 25 ago. 2021

DIAS, G.B.M. *et al.* Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. **Experimental Parasitology**, v.135, p. 511–517, 2013.

GRUENDLING, A.P. *et al.* Impact of Benznidazole on Infection Course in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 6, p.1178-1189, 4 mai. 2015.

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. Maringá. 2019.

TESTON, A.P.M. *et al.* Therapeutic effects of benznidazole in Swiss mice that are orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV strains from the Western

30º Encontro Anual de Iniciação Científica
10º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



11 e 12 de novembro de
2021

Brazilian Amazon. **Experimental Parasitology**, v. 228, p. 108-136, set. 2021.