

EFEITOS DA ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL COM O ICM-20^a EM CAMUNDONGOS INOCULADOS POR VIA ORAL COM A CEPA COLOMBIANA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Maria Julia Rossi Mendes (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Marcelo Eduardo Cardozo, Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager, Marcella Paula Mansano Sarto (co-orientador), Max Jean de Ornelas Toledo (Orientador). E-mail: mjotoledo@uem.br.

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

Ciências Biológicas, Parasitologia, Protozoologia Parasitária Humana.

Palavras-chave: Doença de Chagas; drogas antiparasitárias; infecção experimental.

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, acomete milhões de pessoas mundialmente. Os medicamentos disponíveis para o seu tratamento apresentam efeitos adversos consideráveis e eficácia limitada, fazendo-se necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas. Nesse sentido, o projeto objetivou avaliar os aspectos histopatológicos e moleculares de camundongos infectados por via oral com *T. cruzi* e tratados com a associação de benznidazol (BNZ) com ICM-20^a durante a fase aguda da infecção. Foram utilizados camundongos BALB/c inoculados por via oral ou intraperitoneal com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura da cepa colombiana de *T. cruzi* I e divididos em grupos controles (não infectados e não tratados; infectados e não tratados), tratados com 100 mg/kg/dia de BNZ, tratados com ICM-20^a e tratados com ICM-20^a + BNZ 5 mg/kg/dia. Ao final dos tratamentos os animais foram submetidos à imunossupressão e realizou-se coleta de sangue e de tecido muscular cardíaco e esquelético para análise por PCR em tempo real e análise histopatológica. Observou-se que a associação de dose menor de BNZ (5 mg) com ICM-20^a promoveu supressão da parasitemia, redução da carga parasitária tecidual e das alterações histopatológicas, comparáveis à dose terapêutica de BNZ (100 mg), porém, sem a necessidade de expor os animais aos efeitos nocivos de tal dose.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas (DC) é uma infecção causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, que acomete cerca de 7 milhões de pessoas no mundo, sendo considerada uma doença negligenciada (WHO, 2023). O seu tratamento é baseado em duas alternativas terapêuticas disponíveis: benznidazol (BNZ) e nifurtimox, medicamentos que causam séria toxicidade e requerem cursos prolongados de tratamento com taxas de cura insatisfatórias. No entanto, estudos recentes *in vitro* conduzidos por Desoti et al. (2015) evidenciaram os efeitos tripanocidas do ICM-20^a

como uma potencial alternativa terapêutica da DC. Ademais, a transmissão de *T. cruzi* pode ocorrer principalmente via vetor (insetos triatomíneos) ou por via oral. Atualmente, a infecção oral é o mecanismo de transmissão mais frequente no Brasil, correspondendo a mais de 80% dos novos casos de infecção nas últimas décadas, a maioria ocorrendo na região amazônica, onde a linhagem genética (ou unidade de tipagem distinta – DTU) *T. cruzi* I (Tcl) é prevalente (NÓBREGA et al., 2009). Assim, o trabalho visa avaliar os efeitos da associação do BNZ com o ICM-20^a em camundongos inoculados por via oral com uma cepa Tcl, durante a fase aguda da infecção. Além da eficácia dos tratamentos, será avaliada a carga parasitária sanguínea e tecidual, e realizadas análises histopatológicas do tecido muscular cardíaco e esquelético dos animais tratados e controles não tratados.

MATERIAIS E MÉTODOS

Grupos experimentais e inoculação dos camundongos: Foram utilizados 80 camundongos BALB/c machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, inoculados por via oral (OR) ou intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos derivados de cultura e divididos em oito grupos experimentais: (1) Controle não infectado e não tratado; (2) Controle infectado por via OR e não tratado; (3) Controle infectado por via IP e não tratado; (4) Infectado por via OR e tratado com BNZ 100 mg/kg/dia; (5) Infectado por via OR e tratado com ICM-20^a; (6) Infectado por via IP e tratado com ICM-20^a; (7) Infectado por via OR e tratado com ICM-20^a + BNZ 5 mg/kg/dia; (8): Infectado por via IP e tratado com ICM-20^a + BNZ 5 mg/kg/dia. **Avaliação da parasitemia:** Foi realizada diariamente a partir do 3º dia após a inoculação até a negativação, por meio da contagem microscópica direta. **Imunossupressão:** Os animais com resultados negativos nos exames parasitológicos foram submetidos à imunossupressão com ciclofosfamida (Cy) 50 mg/kg/dia, e após três semanas os que permaneceram com parasitemia subpatente foram eutanasiados e seu sangue coletado para análise por PCR em tempo real (qPCR). **Análises por qPCR e histopatológicas:** A qPCR foi realizada tanto para detectar DNA de *T. cruzi* quanto para quantificar a carga parasitária (CP) sanguínea e tecidual. Os tecidos dos músculos cardíaco e esquelético (ME) foram coletados, fixados em solução de Bouin e preparados em parafina. Os cortes foram corados com hematoxilina-eosina (HE) e analisados em microscopia de luz, sendo quatro seções por animal, com 10 campos microscópicos por seção e objetiva de 40X. Foram avaliados parâmetros quantitativos e qualitativos. Animais que apresentaram resultado negativo no exame de sangue a fresco e qPCR foram considerados curados e aqueles com resultado positivo em pelo menos um desses testes foram considerados falha terapêutica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As curvas de parasitemia média dos animais durante os tratamentos experimentais são apresentadas na Figura 1. Os animais tratados com ICM-20^a + BNZ 5 mg/kg apresentaram os menores níveis de parasitemia, principalmente aqueles inoculados

por via OR que permaneceram com parasitemia subpatente por todo o curso do tratamento, indicando benefícios dessa associação.

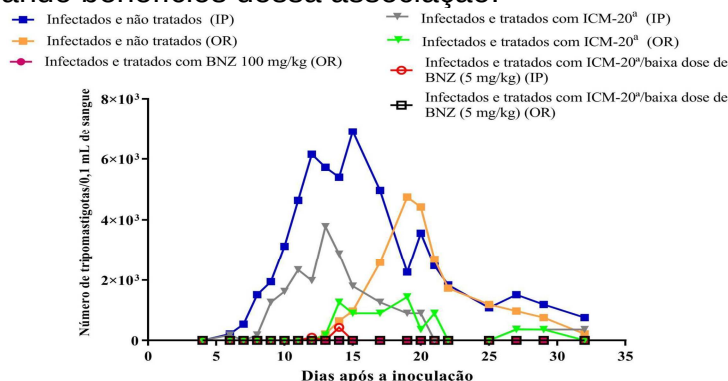


Figura 1 – Curvas de parasitemia média de camundongos BALB/c inoculados com a cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi* (DTU TcI) por via intraperitoneal (IP) ou por via oral (OR), tratados com benznidazol (BNZ) 100 mg/kg/dia, com ICM-20ª ou com ICM-20ª + BNZ 5 mg/kg/dia e respectivos controles não tratados. Inóculo: 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos derivados de cultura/animal.

As reduções mais significativas na CP determinada por qPCR foram obtidas utilizando ICM-20ª + BNZ 5 mg/kg/dia, tanto na infecção por via OR como na infecção por via IP, quando comparado aos grupos controle NT e tratado com ICM-20ª, no ME e no músculo cardíaco (Figura 2). Logo, na infecção oral, o tratamento com a associação ICM-20ª + BNZ 5 mg promoveu resultados semelhantes à dose terapêutica de BNZ.

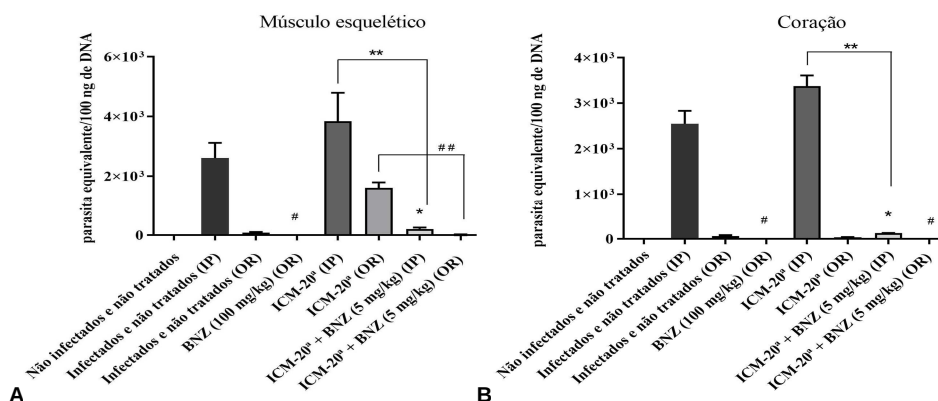


Figura 2 – Carga parasitária de camundongos BALB/c infectados por via intraperitoneal (IP) ou oral (OR) com a cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi* (DTU TcI), submetidos a diferentes tratamentos e controles não tratados (NT). A - No músculo esquelético: # diferença significativa ($p=0,02$) em relação ao grupo OR NT; ## diferença significativa ($p=0,009$) entre os grupos OR, tratado com ICM-20ª e com ICM-20ª + BZ 5 mg; * diferença significativa ($p=0,01$) em relação ao grupo IP NT; ** diferença significativa ($p=0,006$) em relação ao grupo IP tratado com ICM-20ª. B - No músculo cardíaco: # diferenças significativas entre os grupos OR, tratados com BNZ 100 mg ($p=0,001$) ou ICM-20ª + BNZ 5 mg ($p=0,02$), em comparação com o grupo OR NT; * diferença significativa ($p=0,03$) em comparação com o grupo IP NT; ** diferença significativa ($p=0,002$) em relação ao grupo IP e tratado com ICM-20ª.

Quanto à análise histológica, os parâmetros incluíram a presença e intensidade de parasitismo tecidual, processo inflamatório (PI), necrose e fibrose tecidual. Os animais do grupo OR NT apresentaram PI focal e discreto, áreas de fibrose leves e presença de raros ninhos de amastigotas (Figura 3B). Um tropismo acentuado para o músculo cardíaco foi observado na infecção por via IP, onde a média de ninhos foi de $9 \pm 0,5$ (Figura 3C). Resultados semelhantes foram observados no ME, no entanto, não havia ninhos de amastigotas nos animais infectados por via OR, enquanto que nos infectados por via IP a média de ninhos de amastigotas foi de $0,8 \pm 0,5$, sugerindo uma menor virulência da via OR em comparação à via IP.

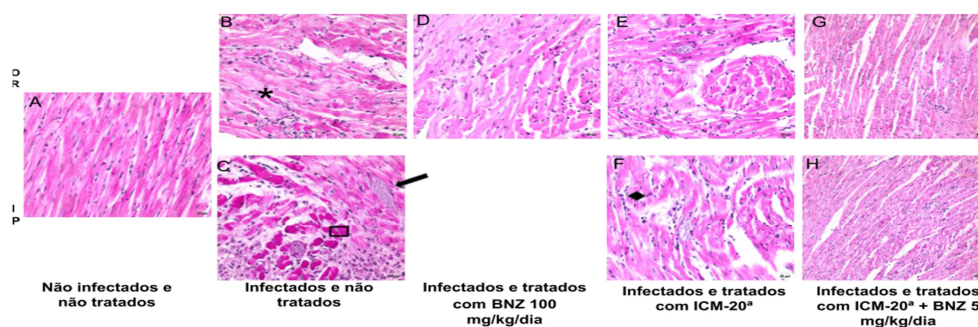


Figura 3 – Microfotografias das alterações histopatológicas do tecido cardíaco de camundongos BALB/c infectados por via intraperitoneal (IP) ou oral (OR) com a cepa colombiana de *Trypanosoma cruzi* (DTU Tci), tratados com benznidazol (BNZ) em diferentes doses e com ICM-20^a, isoladamente e em associação, e controles não tratados. Seta: ninho de amastigotas; <>: infiltrados inflamatórios; * fibrose; ■ necrose.

CONCLUSÕES

A partir das análises apresentadas, fica evidente os efeitos terapêuticos da associação de dose menor de BNZ com ICM-20^a, que promoveu benefícios como supressão da parasitemia e redução das cargas parasitárias nos tecidos musculares analisados, e das alterações histológicas, comparáveis aos efeitos da dose terapêutica de BNZ, porém sem estar sujeito aos seus efeitos nocivos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, Universidade Estadual de Maringá e orientadores.

REFERÊNCIAS

DESOTI, V. et al. The combination of vitamin K3 and vitamin C has synergic activity against forms of *Trypanosoma cruzi* through a redox imbalance process. **PloS One**, v. 10, n. 12, p. e0144033, 2015.

NÓBREGA, A. A. et al. Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 653–655, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 9 set. 2023.