



AVALIAÇÃO DO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E DA RESPOSTA QUIMIOTERÁPICA COM BENZONIDAZOL EM CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI* RESISTENTES E SUSCETÍVEIS

ISA RITA BRITO DE MORAIS; ASTRIA DIAS FERRÃO GONZALES; JÚLIA FÁTIMA CARIBÉ PEREIRA; FELIPE BERG; MARCOS LÁZARO DA SILVA GUERREIRO

RESUMO

Objetivo: No atual trabalho utilizamos as cepas do *T. cruzi*, Y e Colombiana, susceptível e resistentes ao Benzonidazol, com o objetivo de avaliar o comportamento biológico e o grau de susceptibilidade/resistência. **Material e Métodos:** Para o estudo, foi inoculado via intraperitoneal 5×10^4 formas tripomastigotas sanguícolas de sangue citratado em 120 camundongos suíços, não isogênicos, pesando 12 a 15 g, mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia. Os animais foram subdivididos em grupos experimentais tratados e não tratados, e mantidos dentro das exigências do Comitê de Ética de Uso de Animais. O tratamento com Benzonidazol foi administrado por entubação esofágica, na dose de 100mg/Kg/dia, durante 90 dias. O comportamento biológico foi avaliado pelas curvas de parasitemia e índices de mortalidade. A parasitemia foi realizada randomicamente em cinco camundongos em todos os grupos experimentais pelo exame direto do sangue periférico, ao microscópio óptico, entre lâmina e lamínula diariamente mediante a média da contagem dos parasitos em 50 campos (400X). A mortalidade cumulativa foi acompanhada diariamente nos diferentes grupos experimentais até o final do estudo. A análise da resistência/susceptibilidade foi avaliada pelos testes de cura parasitológica (xenodiagnóstico, hemocultura e subinoculação em camundongos) realizados 45 dias após o término do tratamento, nos camundongos dos grupos experimentais tratados e não tratados sobreviventes. **Resultados:** O grupo infectado com cepa Y e não tratado apresentou pico parasitêmico no 8º dia após a infecção, decaindo após este período, o que coincide com a morte total dos animais, impedindo a análise tardia. O grupo infectado e tratado com Benzonidazol, apresentaram negatização da parasitemia logo após a administração do quimioterápico, demonstrando susceptibilidade tratamento. Os animais infectados com a cepa Colombiana apresentaram picos mais tardios e irregulares, com negatização a partir do 25º dia de infecção, tanto nos grupos tratados como nos não tratados, comportamento biológico característico à sua classificação biológica, em Biodema Tipo III. Os testes de cura analisados randomicamente revelaram na cepa Y 50% de cura parasitológica, enquanto os animais infectados com a cepa Colombiana apresentaram 0% de cura. **Conclusão:** Concluimos que o comportamento biológico a susceptibilidade/resistência o foi mantida nas cepas mesmo após sucessivas.

Palavras-chave *Trypanosoma cruzi*, Cepas, Benzonidazol, Comportamento biológico, susceptibilidade/resistência

1 INTRODUÇÃO

Análises morfológicas de tripomastigotas sanguícolas permitiram definir, claramente, a existência de heterogeneidade no comportamento biológico, detectada nas diferentes cepas de *T. cruzi*, desde os primeiros trabalhos de (Carlos Chagas, 1909; Andrade, 1974). As curvas de

parasitemia e a taxa de mortalidade representam a multiplicação parasitária durante o curso da infecção podendo ser utilizadas para análise das variações intraespecíficas na caracterização de cepas de *T. cruzi*, relacionadas comportamento biológico, virulência, patogenicidade e resposta ao quimioterápico.

O aparecimento das formas delgadas decorre da multiplicação parasitária intensa em cepas resistentes, enquanto que as formas largas prevalecem em cepas mais suscetíveis ao quimioterápico e menos virulentas no decurso da infecção (BRENER e CHIARI, 1963; ANDRADE *et al.*, 1970; ANDRADE, 1974). Estudos clínicos e experimentais já demonstraram haver uma variação de comportamento biológico, resistência/susceptibilidade e variabilidade gênica do patógeno em *T. cruzi* I e II, relacionada as diferentes áreas geográficas (JUNIOR *et al.*, 2017; ZINGALES *et al.*, 2009).

Os estudos sobre a quimioterapia da doença de Chagas têm demonstrado nítidas diferenças de suscetibilidade ao quimioterápico Benzonidazol, em diferentes cepas do *T. cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2005; MOREIRA *et al.*, 2023; VIOTTI *et al.*, 2011). ANDRADE *et al.* (1992), em estudo experimental de onze cepas de *T. cruzi*, isoladas por xenodiagnóstico e por subinoculação a partir de pacientes da região central do Brasil, os quais foram submetidos à quimioterapia, revelou uma taxa de cura entre 66 e 100%, em camundongos infectados com cepas do Tipo II, e de 0-9% nos animais infectados com cepas do Tipo III, a correlação entre os resultados do tratamento em pacientes e em camundongos foi de 81,8% (9 de 11 casos), envolvendo as cepas do Biodema Tipo II / *T. cruzi* II, os quais diferem quanto à susceptibilidade aos quimioterápicos, esses achados foram confirmados e explicados pela composição multiclonal das cepas de *T. cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2005).

DE CASTRO *et al.* (2006), estudando a ação do tratamento com Benzonidazol em 27 pacientes na fase crônica da doença de Chagas tratados e não tratados, observaram mudança no perfil da parasitemia via hemocultura, revelando um sucesso de 88,8% contra 11,2% de insucesso na reversão dessas parasitemias, onde concluíram ser o Benzonidazol, uma forte droga de efeito tripanocida. VIOTTI *et al.* (2011), avaliando a ação do tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase crônica, revelaram ser o tratamento um fator de impacto sobre a sorologia específica, levando a uma sorologia negativa completa ou parcial nos níveis de anticorpos anti *T. cruzi*, que consistiu em uma possível eliminação ou redução da carga parasitária. Diante do exposto, nosso estudo teve como objetivo, avaliar o comportamento biológico e a resistência ao Benzonidazol nas cepas Y *T. cruzi* I suscetível e Colombiana *T. cruzi* I resistente, após múltiplas passagens em camundongos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram utilizadas as cepas Y e Colombiana com diferentes índices de susceptibilidade ao Benzonidazol. Essas cepas foram mantidas através de passagens sucessivas em camundongos, em meio de cultura acelular e criopreservação. Para o estudo, foi inoculado via intraperitoneal 5×10^4 formas tripomastigotas sanguíneas de sangue citratado em 120 camundongos suíços webster, não isogênicos, pesando 12 a 15 g, mantidos no Biotério do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, Bahia. Os animais foram subdivididos em grupos experimentais tratados e não tratados, e mantidos dentro das exigências básicas do Comitê de Ética de Uso de Animais. O tratamento com Benzonidazol ([2-nitro-N-(fenilmetil) - 1 H-imidazol-1-acetamida]: Rochagan[®], [Roche]) foi administrado por entubação esofágica, na dose de 100mg/Kg/dia, durante 90 dias.

O comportamento biológico foi avaliado pela parasitemia e mortalidade. A parasitemia foi realizada em cinco camundongos em todos os grupos experimentais pelo exame direto do sangue periférico, ao microscópio óptico, entre lâmina e lamínula diariamente mediante a média da contagem dos parasitos em 50 campos microscópicos (400X). A mortalidade cumulativa foi

acompanhada diariamente nos diferentes grupos experimentais até o final do estudo.

A análise da resistência/susceptibilidade foi avaliada pelos testes de cura parasitológica (xenodiagnóstico, hemocultura e subinoculação em camundongos) realizados 45 dias após o término do tratamento, nos camundongos dos grupos experimentais tratados e não tratados. Para o xenodiagnóstico, os animais foram colocados em decúbito dorsal e utilizou-se ninfas de 3º a 5º estágio para sugarem o sangue periférico. Ao final, os animais foram eutanasiados por exsanguinação após anestesia com Ketamina e Xilazina (80mg/Kg de peso), e o sangue coletado foi utilizado para hemocultura e subinoculação em camundongos recém-nascidos.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Comparação dos níveis parasitêmicos de animais infectados com as cepas Y e Colombiana do *T. cruzi*, tratados e não tratados com Benzonidazol.

Levando-se em consideração as diferentes respostas das cepas frente à ação do quimioterápico mais utilizados na terapia da doença de Chagas, o atual trabalho avaliou experimentalmente a influência do Benzonidazol sobre o comportamento biológico.

As figuras 1 e 2, representam a análise das parasitemias dos grupos infectados com a cepa Y e Colombina tratados e não tratados com Benzonidazol. O grupo infectado com cepa Y e não tratado apresentou pico parasitêmico no 8º dia após a infecção, decaindo após este período, o que coincide com a morte em massa dos animais, impedindo a análise até o 30º dia de infecção. Já o grupo infectado e tratado com Benzonidazol, apresentaram uma queda na parasitemia logo após a administração do quimioterápico, ficando negativa durante todo o período do tratamento. Diferentemente da cepa Y, os animais infectados com a cepa Colombiana apresentaram um pico mais tardio na parasitemia, correspondente ao seu comportamento biológico e à sua classificação biológica, Biodema Tipo III. Nos grupos infectados e tratados, o pico da parasitemia foi no 21º dia de infecção, decaindo após este período que corresponde ao início do tratamento. Como esperado, o grupo de animais infectados e não tratados apresentou um aumento da parasitemia após o 21º dia de infecção, tendo seu pico no 25º dia, decaindo após este período até o 30º dia.

Figura 1. Parasitemia representativa dos números de parasitos circulantes em camundongos suíços infectados com a cepa Y do *T. cruzi* foram avaliados quanto a parasitemia em sangue periférico durante o período de tratamento quimioterápico com Benzonidazol.

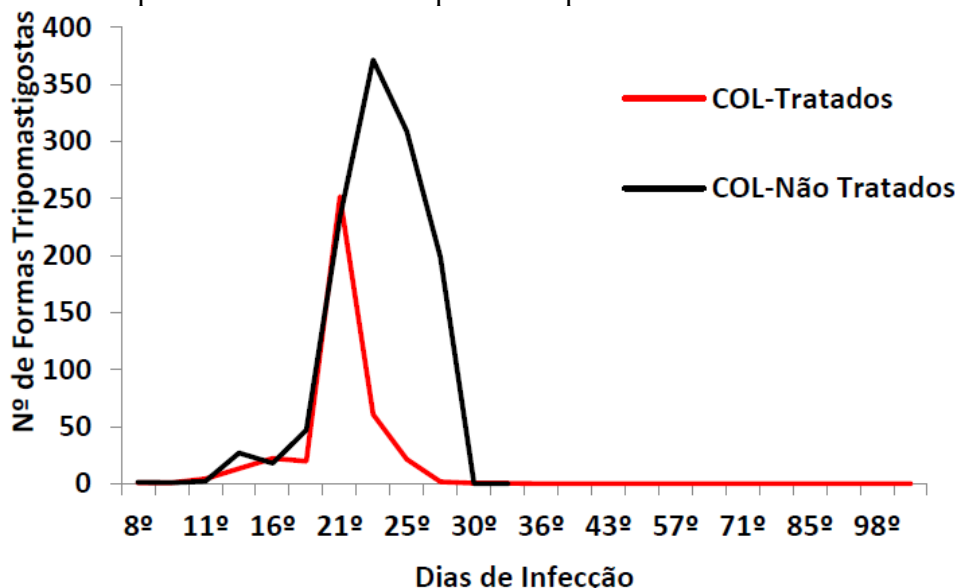
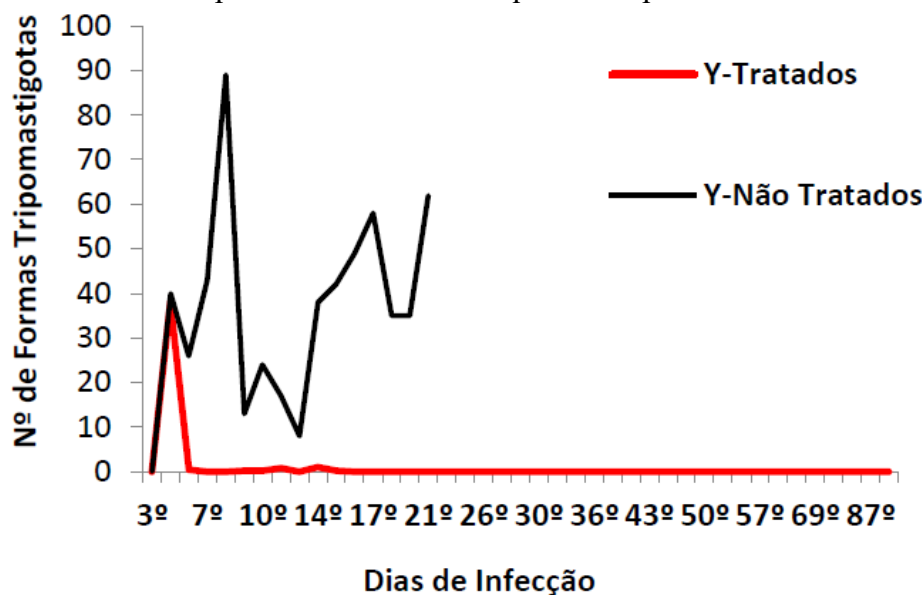


Figura 2. Parasitemia representativa dos números de parasitos circulantes em camundongos suíços infectados com a cepa Colombiana do *T.cruzi* foram avaliados quanto a parasitemia em sangue periférico durante o período de tratamento quimioterápico com Benzonidazol.



Avaliação da mortalidade nos grupos infectados tratados e não tratados com Benzonidazol, nas cepas Y e Colombiana.

Tanto na cepa Y quanto na Colombiana, os grupos que foram infectados, mas que não foram submetidos ao tratamento com Benzonidazol, apresentaram uma mortalidade nitidamente maior quando comparados com os grupos infectados e tratados, como mostrado nas figuras a seguir (**Figuras 3 e 4**). Certamente, o efeito tripanocida do Benzonidazol permitiu uma queda no número de parasitas circulantes, prolongando a vida dos animais.

Figura 3. Avaliação da mortalidade cumulativa nos animais infectados com a cepa Y, tratados e não tratados.

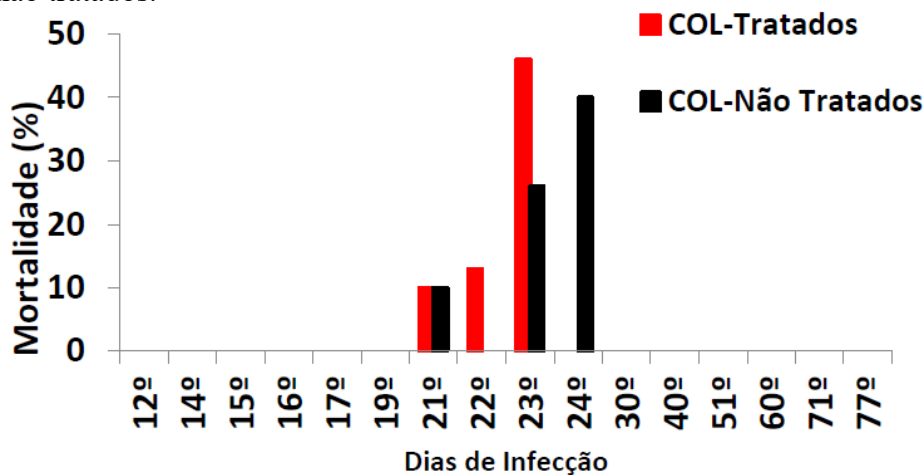
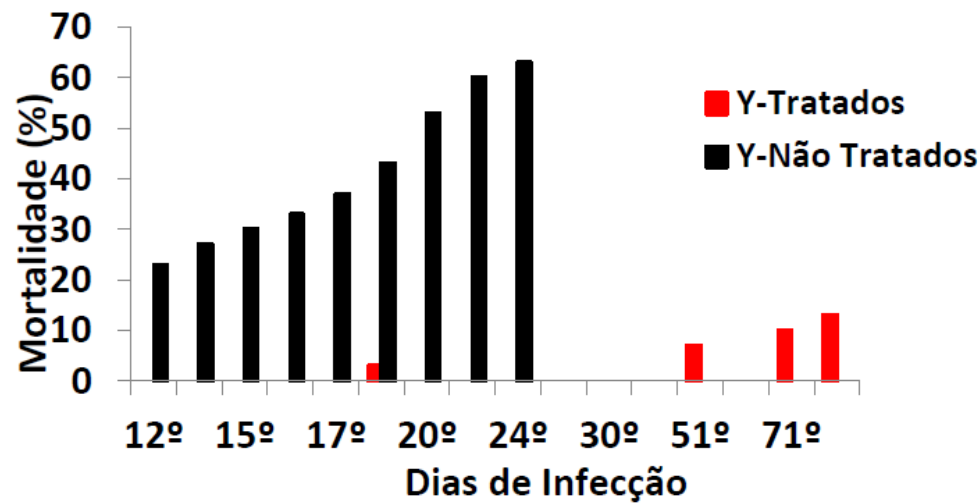


Figura 4. Avaliação da mortalidade cumulativa nos animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não tratados.



Os resultados do presente trabalho permitiram demonstrar susceptibilidade/resistência do tratamento com Benzonidazol quando correlacionamos os resultados dos diversos grupos experimentais submetidos e não submetidos ao tratamento quanto: à parasitemia, taxa de mortalidade. A taxa de mortalidade dentro dos vários grupos variou paralelamente com as curvas parasitêmicas, sendo menos elevadas na cepa Y tratada. Essa baixa mortalidade nos grupos tratados e de alta mortalidade 100% no não tratados, apresentada pela cepa suscetível ao quimioterápico, foi concordante com os dados da literatura e, de estudos anteriores (ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2008, CAMANDAROBÁ *et al.*, 2006; CAMPOS *et al.*, 2005).

Análise dos testes de cura parasitológica em camundongos infectados com cepas Y e Colombiana suscetível e resistente ao Benzonidazol.

Os camundongos infectados com cada cepa e tratados durante 90 dias com Benzonidazol, foram submetidos aos testes de cura parasitológicos após 45 dias do término do tratamento. Foi analisado randomicamente os sobreviventes após o período de tratamento, os animais infectados com a cepa Y apresentaram 50% de cura parasitológica, enquanto os animais infectados com a cepa Colombiana apresentaram 0% de cura (Tabela 1).

Tabela 1–Testes de cura parasitológicos em camundongos infectados com a cepa Y e Colombiana do *T.cruzi*, após 45 dias do término do tratamento com Benzonidazol.

RESULTADOS DOS TESTES DE CURA PARASITOLÓGICA DAS CEPA Y E COLOMBIANA

Identificação	**Parasitemia***	Xeno***	Subinocu. ***	Hemocultura ***	Resultado
Y B10	Neg	Neg	Neg	Neg	Negativo
Y B11	Neg	Neg	Neg	Neg	Negativo
Y B12	Neg	Neg	Neg	Neg	Negativo
Y B13	Neg	Posit	Posit	Neg	Positivo
Y B14	Neg	Posit	Posit	Neg	Positivo
Y B15	Neg	Posit	Posit	Neg	Positivo
COL B24	Neg	Posit	Posit	Neg	Positivo
COL B25	Neg	Posit	Posit	Neg	Positivo

COL B26	Neg	Posit	Posit	Neg	Positivo
Legenda: Posit (positivo); Neg. (negativo); ** Identificação dos camundongos submetidos ao tratamento quimioterápico; *** Testes avaliados após dose imunossupressiva de Ciclofosfamida.					

A tabela descrita acima, confirma a susceptibilidade/resistência, pelos índices de cura utilizando os achados em conjunto. Investigações já demonstraram que experimentalmente a infecção pelo *T. cruzi*, apresentam um amplo espectro de comportamento biológico associado as diferentes cepas (ANDRADE, 1999; CAMANDAROBÁ *et al.*, 2006).

Estudos longitudinais, clínicos e experimentais, realizados por vários autores têm revelado que a manutenção da infecção experimental e humana e diferentes os diferentes comportamentos biológicos nas cepas de *T. cruzi* é multifatorial, onde cerca de 20% a 30% dos indivíduos infectados (camundongos ou humanos), negativam as parasitemias, apresentam índices de mortalidade variáveis e evoluem para uma forma crônica cardíaca indeterminada somente detectada a infecção por exames sorológicos, sendo muitos dos fatores imunoregulatórios responsáveis por tal fenômeno, ainda desconhecidos (ANDRADE, 1999; ANIS RASSI e MARIN-NETO, 2000; CAMANDAROBÁ *et al.*, 2006; SATHLER-AVALAR *et al.*, 2009). Esses dados que corroboram com nossos achados atuais no tocante aos índices de cura e susceptibilidade/resistência.

4 CONCLUSÃO

Concluimos que a susceptibilidade ao Benzonidazol foi mantida na cepa Y suscetível e a resistência na cepa Colombina, após a análise em conjunto dos testes de cura parasitológica. As sucessivas passagens nos diversos meios cultura, camundongos de diferentes linhagens e criopreservação não foi capaz de alterar o comportamento biológico das cepas estudadas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev. Patol. Trop.**, v. 3, p. 121-165, 1974.
- ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 70, p. 32-42, 1970.
- ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: Clonal Structure of Parasite Strains and the Importance of Principal Clones. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 185-187, 1999.
- ANDRADE, S.G. et al. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 624-626, 1992.
- ANDRADE, S.G. et al. Reinfections with different strain of *Trypanosoma cruzi*, as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2006.
- ANDRADE, S.G. et al. Importance of TNF-alpha in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 103, p. 1, p. 21-26, 2008.

ANIS, R.J.; MARIN-NETO, J.A. Cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Cardiol.**, v. 10, n. 4, p. 6-22, 2000.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 16, p. 39-46, 1963.

CAMPOS, R.F. et al. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biodeme Type II, *Trypanosoma cruzi* II) **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 2, p. 142-146, 2005.

CAMANDAROBA, E. L. et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain clones isolated from the acute phase of murine infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v 101, p. 613-5, 2006.

DE CASTRO, A.M. et al. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Res.**, v. 99, n. 4, p. 379-383, 2006.

MOREIRA, RL. Et al. Benzonidazole treatment has a beneficial effect on cells infected with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** v. 45, n. 6, p, 2023.

SATHLER-AVELAR, R. VITELLI- AVELAR, DM. TEIXEIRA-CARVALHO, A. MARTINS-FILHO, A.O. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, Suppl. I, p. 246-251, 2009.

VIOTTI, R. et al. Impact of Aetiological Treatment on Conventional and Multiplex Serology in Chronic Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 5, n. 9, p. 1314, 2011.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.