



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

**Quimioterapia experimental: combinação do alopurinol com o benzonidazol, em camundongos infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda da doença de Chagas**

**Gabriel Silva Peleteiro**

Salvador (Bahia)  
Agosto, 2014

UFBA/SIB/Bibliotheca Gonçalo Moniz: Memória da Saúde Brasileira

Peleteiro, Gabriel Silva

P382 Quimioterapia experimental: combinação do alopurinol com o benzonidazol, em camundongos infectados pela cepa Y do *trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda da doença de Chagas / Gabriel Silva Peleteiro. Salvador: GS, Peleteiro, 2014.

VI; 25 fls.:il.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Sonia Gumes Andrade.

Monografia como exigência parcial e obrigatória para Conclusão do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Bahia (FMB) da Universidade Federal da Bahia (UFBA).

1. Doença de Chagas. 2. Quimioterapia. 3. Alopurinol. 4. Benzonidazol. 5. *Trypanosoma cruzi* I. Andrade, Sonia Gumes. II. Universidade Federal da Bahia. Faculdade de Medicina. III. Título.

CDU: 616.937



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA**  
Fundada em 18 de fevereiro de 1808



## **Monografia**

# **Quimioterapia experimental: combinação do alopurinol com o benzonidazol, em camundongos infectados pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda da doença de Chagas**

**Gabriel Silva Peleteiro**

Professor orientador: **Sonia Gumes Andrade**

Monografia de Conclusão do Componente Curricular MED-B60/2014.1, como pré-requisito obrigatório e parcial para conclusão do curso médico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, apresentada ao Colegiado do Curso de Graduação em Medicina.

Salvador (Bahia)  
Agosto, 2014

**Monografia:** *Quimioterapia experimental: combinação do alopurinol com o benzonidazol, em camundongos infectados pela cepa Y do Trypanosoma cruzi, durante a fase aguda da doença de Chagas*, de **Gabriel Silva Peleteiro**.

Professor orientador: **Sonia Gumes Andrade**

### **COMISSÃO REVISORA**

- **Sonia Gumes Andrade** (Presidente, Professor orientador), Professora aposentada do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Aurea Angélica Paste**, Professora do Departamento de Medicina Interna e Apoio Diagnóstico da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Rita de Cássia Fernandes**, Professora do Departamento de Medicina Preventiva e Social da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.
- **Milena Magalhães Aleluia**, Doutorando do Curso de Doutorado do Programa de Pós graduação em Patologia (PPgPat) da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia.

**TERMO DE REGISTRO ACADÊMICO:** Monografia avaliada pela Comissão Revisora, e julgada apta à apresentação pública no VII Seminário Estudantil de Pesquisa da Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA, com posterior homologação do conceito final pela coordenação do Núcleo de Formação Científica e de MED-B60 (Monografia IV). Salvador (Bahia), em \_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014.

## **EQUIPE**

- Gabriel Silva Peleteiro, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA. Correio-e: gabrielpeteiro@hotmail.com;
- Sonia Gumes Andrade, Faculdade de Medicina da Bahia/UFBA;

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

### **UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**

- Faculdade de Medicina da Bahia (FMB)

### **CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MUNIZ (CPqGM – Fiocruz)**

- Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI)

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"><li>1. Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB); e</li><li>2. Recursos próprios.</li></ol> |
|---|

## AGRADECIMENTOS

- ◆ À minha Professora orientadora, Doutora **Sonia Gumes Andrade**, pela sua dedicação à construção do meu trabalho e sua participação no meu desenvolvimento científico e profissional.
- ◆ Aos Doutores **Aurea Angélica Paste** e **Rita de Cássia Fernandes**, e à Doutoranda **Milena Magalhães Aleluia**, membros da Comissão Revisora desta Monografia, pelo tempo dedicado à revisão e contribuições para o trabalho.
- ◆ Aos meus Colegas do Laboratório, Doutor **Marcos Lázaro**, **Marcio Cerqueira**, e os acadêmicos **Beatriz Carvalho** e **Amanda Catariny**, pela colaboração e troca de aprendizado das diversas técnicas e procedimentos necessários para a realização desta monografia.

## SUMÁRIO

<b>ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS</b>	<b>2</b>
<b>I. RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>II. OBJETIVOS</b>	<b>4</b>
<b>III. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>5</b>
<b>IV. METODOLOGIA</b>	<b>7</b>
<b>V. RESULTADOS</b>	<b>11</b>
<b>VI. DISCUSSÃO</b>	<b>18</b>
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	<b>21</b>
<b>VIII. SUMMARY</b>	<b>22</b>
<b>IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>23</b>
<b>X. ANEXOS</b>	
•ANEXO I: Parecer da comissão de ética no uso de animais	<b>25</b>

**ÍNDICE DE FIGURAS, GRÁFICOS, QUADROS E TABELAS**

- GRÁFICO 1.** Mortalidade Cumulativa (%) em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com benzonidazol (BZ) e/ou alopurinol (ALO) **11**
- GRÁFICO 2.** Níveis parasitêmicos em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com benzonidazol (BZ) e/ou alopurinol (ALO) **12**
- TABELA 1.** Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos Suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ). **13**
- TABELA 2.** Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos Suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol e 60mg/kg/dia de alopurinol (BZ + ALO). **14**
- TABELA 3.** Índices de cura, de camundongos Suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ) e benzonidazol em combinação com alopurinol (BZ + ALO) baseado na combinação dos testes parasitológicos e sorológicos. **15**
- FIGURA 1.** Secção de tecidos de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com benzonidazol (BZ) em coloração HE **16**
- FIGURA 2.** Secção de tecidos de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com benzonidazol e alopurinol (BZ+ALO) em coloração HE **17**



## I – RESUMO

### **QUIMIOTERAPIA EXPERIMENTAL: COMBINAÇÃO DO ALOPURINOL COM O BENZONIDAZOL, EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELA CEPA Y DO *TRYPANOSOMA CRUZI*, DURANTE A FASE AGUDA DA DOENÇA DE CHAGAS.**

**Introdução:** A doença de Chagas é uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. No Brasil, o benzonidazol é a única droga disponível para o tratamento específico da doença. A combinação de outros fármacos com o benzonidazol pode ser uma nova estratégia terapêutica para a doença de Chagas. **Objetivo:** Avaliar o efeito do tratamento com benzonidazol associado ao alopurinol, sobre o curso da infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos Suíços, durante a fase aguda da doença de Chagas.. **Métodos:** Estudo experimental utilizando 49 camundongos Suíços albinos, não isogênicos e de ambos os sexos. Foram divididos em 4 grupos: I – Controles infectados e não tratados; II – Tratados com 100mg/kg/dia de benzonidazol; III – Tratados com 60mg/kg/dia de alopurinol IV - Tratados com benzonidazol + alopurinol. O tratamento foi iniciado no 9º dia pós-infecção e foram administradas 60 doses dos medicamentos. A parasitemia e mortalidade foram acompanhados diariamente. 60 dias após o final do tratamento foram realizados os seguintes testes de cura: xenodiagnóstico, i, hemocultura, imunofluorescência indireta e análise histopatológica do coração e músculo esquelético. **Resultados:** Houve mortalidade de 100% dos camundongos nos grupos I e III, 5,26% no grupo IV e 0% no grupo II. Os testes de cura apontaram cura parasitológica em 100% dos camundongos nos grupos II e IV e negatificação sorológica em 60% dos animais do grupo II e em 100% do grupo IV. A análise histopatológica evidenciou menor grau de lesão tissular nos camundongos tratados com a combinação dos dois medicamentos. **Discussão:** Ainda que a monoterapia com alopurinol não seja eficaz para controle parasitário da doença de Chagas na fase aguda, sua associação com benzonidazol pode ser importante para aumentar a taxa de cura e diminuir as lesões tissulares encontradas no coração e músculo esquelético na fase crônica da doença. **Conclusão:** Os resultados do tratamento do benzonidazol associado com alopurinol mostraram a eficácia curativa da quimioterapia combinada e nítida diminuição das lesões em miocárdio e músculo esquelético.

**Palavras-chaves:** Doença de Chagas, Quimioterapia, Alopurinol, Benzonidazol, *Trypanosoma cruzi*.

## **II - OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GERAL**

Avaliar o efeito do tratamento com benzonidazol associado ao alopurinol, sobre o curso da infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos Suíços, durante a fase aguda da doença de Chagas.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Avaliar isoladamente, o efeito das doses do benzonidazol e do alopurinol, em animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi*;
2. Testar a combinação do benzonidazol com o alopurinol e avaliar sua eficácia em comparação com a administração isolada dos referidos fármacos em animais infectados;
3. Estudo histopatológico dos camundongos dos diversos grupos experimentais para avaliação das lesões teciduais pós-tratamento;
4. Submeter os camundongos dos diversos grupos experimentais aos testes de cura parasitológicos e sorológicos (xenodiagnóstico, parasitemia, imunossupressão, hemocultura e reação de imunofluorescência indireta (IFI)).

### III - FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A doença de Chagas é uma antropozoonose causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e tem como vetores os insetos hematófagos da subfamília Triatominae.<sup>1</sup> Os reservatórios naturais do *T. cruzi* são diversas variedades de marsupiais e mamíferos placentários típicos do continente americano que já convivem com o parasita há milhões de anos. A doença no homem é resultado da invasão de ambientes silvestres e do estabelecimento dos vetores em habitações humanas em função da baixa condição socioeconômica da maioria das populações rurais<sup>2</sup>. Estima-se que ainda existam entre 12 e 14 milhões de infectados na América Latina, com mais de 60 milhões de pessoas sob o risco de infecção, em 18 países endêmicos<sup>3</sup>. No Brasil, a estimativa é de 2 a 3 milhões de indivíduos infectados, com uma incidência de 100 novos casos por ano<sup>4</sup>.

Por ser uma doença amplamente distribuída em todo o continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina, e devido à sua alta morbidade e mortalidade a Doença de Chagas segue como um dos mais graves problemas de saúde pública em toda América. Cerca de 17-30% dos pacientes chagásicos crônicos possuem alguma manifestação clínica da doença como miocardiopatia ou dilatação gastrointestinal<sup>1,5</sup>.

Atualmente, somente duas drogas são utilizadas no tratamento da doença de Chagas: nifurtimox [N-(3-metil-1,1-dioxido-1,4-thiazinan-4-il)-1-(5-nitro-2-furil)metanimina: Lampit®, Bayer] e benzonidazol ([2-nitro-N-(fenilmetil)-1 H-imidazol-1-acetamida]: Rochagan®, Roche). No Brasil, o benzonidazol é a única droga disponível para o tratamento específico da doença. O nifurtimox, existente na América Central, pode ser utilizado em caso de intolerância ao benzonidazol ou, eventualmente, em casos de falha terapêutica. O benzonidazol age através da ligação de seus metabólitos com ácido desossirribonucleico (DNA) do parasita e aos seus lipídios e proteínas<sup>6,7,8</sup>.

O benzonidazol no entanto pode apresentar alguns efeitos colaterais que variam desde hipersensibilidades, depleção da medula óssea e polineuropatia periférica a casos mais graves como agranulocitose, trombocitopenia púrpura ou síndrome de Stevens-Johnson. Diversos outros medicamentos têm sido testados para o tratamento da doença de Chagas ao longo dos anos e alguns

destes demonstraram diminuir a carga parasitária no sangue periférico, mas não promoviam bons índices de cura. Contudo, a combinação destes medicamentos com o benzonidazol pode ser uma nova estratégia de tratamento para a doença de Chagas, uma vez que pode aumentar a ação antiparasitária dos diferentes compostos dos fármacos, evitar a resistência do parasita à droga e diminuir as doses dos medicamentos com uma conseqüente redução de sua toxicidade para o organismo<sup>9, 10</sup>.

O alopurinol (1,5-dihidro-4 H-pirazolo [3,4 – d] pirimidina-4-one) usado no tratamento da gota (doença caracterizada pela deposição de ácido úrico nas articulações e órgãos dos pacientes) foi testado com sucesso no tratamento de camundongos na fase aguda da doença de Chagas<sup>11</sup>. O referido fármaco é um análogo da hipoxantina que diminui a produção de ácido úrico, inibindo a conversão da hipoxantina em xantina, interferindo dessa forma, na síntese de purinas<sup>8</sup>. A hipótese mais aceita sobre seu mecanismo de ação é a competição com a adenosina, substância essencial para o metabolismo do *T. cruzi*, visto que ele não consegue sintetizar purinas de novo<sup>12</sup>.

Grupos de camundongos inoculados com seis cepas do *T. cruzi* e tratados com alopurinol na dose de 32 mg/kg de peso corporal por 10 dias consecutivos apresentaram padrões distintos de parasitemia e taxa de mortalidade, indicando diferenças marcantes em relação ao tratamento com esta droga<sup>13</sup>. Além disso, em um estudo tratando-se 404 pacientes chagásicos crônicos com alopurinol, foi observada cura parasitológica em 44% dos casos<sup>14</sup>.

A quimioterapia da doença de Chagas tem demonstrado nítidas diferenças de suscetibilidade aos quimioterápicos em diferentes regiões, o que já foi demonstrado experimentalmente pela existência de cepas resistentes aos fármacos em uso<sup>15,16</sup>. Portanto, partindo do princípio que o benzonidazol e o alopurinol atuam inibindo diferentes mecanismos moleculares do *T. cruzi*, a combinação destas drogas poderá potencializar o efeito anti-*T. cruzi* e evitar o desenvolvimento de resistência dos parasitas.

## IV - METODOLOGIA

### ANIMAL EXPERIMENTAL

Foram utilizados 49 camundongos Suíços albinos, não isogênicos e de ambos os sexos. Os animais foram criados e mantidos com água e ração comercial balanceada *ad libitum* no biotério do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) /Fiocruz/BA.

### ESTUDO COM A CEPA Y

Foi utilizada a cepa Y do *T. cruzi* que apresenta alta susceptibilidade ao benzonidazol. Essa cepa vem sendo mantida através de passagens sucessivas em camundongos, em meio de cultura acelular e criopreservação no Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI)<sup>16</sup>.

### FÁRMACOS

Foram utilizados os seguintes fármacos e suas determinadas doses: **100mg/kg/dia de benzonidazol** ([2-nitro-N-(fenilmetil)-1 H-imidazol-1-acetamida]: Rochagan<sup>®</sup>, [Roche]) e **60mg/kg/dia de alopurinol** (1,5-dihidro-4 H-pirazolo [3,4 – d] pirimidina-4-one).

### INOCULAÇÃO

O inóculo foi obtido por exsanguinação dos animais previamente infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, após anestesia com Xilasina e Ketamina, por secção dos vasos do plexo axilar. Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal, com  $5 \times 10^4$  formas tripomastigotas sanguíneas de sangue citratado provenientes dos animais infectados com a referida cepa. Todos os animais tiveram a infecção confirmada pela detecção do parasito através do exame de sangue a fresco, coletado dos vasos caudais dos animais, e analisado com o uso do microscópio óptico (aumento de 400X).

### GRUPOS EXPERIMENTAIS E ESQUEMA TERAPÊUTICO

A partir de 49 camundongos, foram desenvolvidos os seguintes grupos experimentais:

- I** – 5 camundongos controles infectados com a cepa Y e não tratados;
- II** – 5 camundongos infectados com cepa Y e tratados com 100mg/kg/dia de benzonidazol;
- III** – 20 camundongos infectados com cepa Y e tratados com 60mg/kg/dia de alopurinol;
- IV** – 19 camundongos infectados com a cepa Y tratados com benzonidazol + alopurinol.

O tratamento foi iniciado a partir do 9º dia pós-infecção e foram administradas 60 doses em um período de 86 dias. No subgrupo da associação dos referidos fármacos a administração das doses foi feita da seguinte forma: em primeiro lugar foi administrado o benzonidazol e após 1,5 hora foi administrado o alopurinol.

**PARASITEMIA** – Foi iniciada a partir do 9º dia após a infecção, pelo exame direto em microscópio óptico, entre lâmina e lamínula do sangue periférico de 5 camundongos de cada grupo. Foi feita a média da contagem dos parasitos em 50 campos microscópicos (400x). O acompanhamento da parasitemia foi realizado até o final do período de tratamento.

**MORTALIDADE CUMULATIVA** – Foi acompanhada diariamente até o final do tratamento.

**TESTES DE CURA REALIZADOS NO GRUPO DA CEPA Y** – A partir de 60 dias após o final do tratamento todos os camundongos sobreviventes dos diversos grupos experimentais infectados pela cepa Y foram submetidos aos seguintes testes de cura:

- **PARASITEMIA** - Foi feita a análise em busca dos parasitos em 50 campos microscópicos (400 X) nos camundongos tratados e os controles não tratados.
- **IMUNOSSUPRESSÃO** – Foram administradas 2 doses de ciclofosfamida (250mg/kg) injetadas por via intraperitoneal em cada camundongo e realizada nova parasitemia. A primeira dose foi administrada 04 dias após a última análise da parasitemia, o que

corresponde a 67 dias após o fim do tratamento. A segunda dose foi administrada 20 dias após a primeira.

- **XENODIAGNÓSTICO** – Foi realizado 127 dias após o fim do tratamento utilizando 2 ninfas de *Rhodnius robustus* mantidos em jejum prévio para cada camundongo. Os triatomíneos foram colocados em caixas apropriadas sobre o abdome dos animais, alimentando-se do seu sangue. O resultado foi obtido através da análise das fezes dos triatomíneos quanto à presença de parasitos em microscópio óptico 45 dias após o experimento.
- **HEMOCULTURA** – 0,5mL de sangue dos animais sacrificados foi cultivado em meio de cultura Warren e mantido a uma temperatura de 37°C, e acompanhados durante 60 dias.
- **TESTE SOROLÓGICO: REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (IFI)**  
– O soro dos animais foi coletado e estocado a -20° C para titulação de anticorpos pela técnica de imunofluorescência indireta, usando como antígeno formas de cultura em meio Warren, fixadas em formol e distribuídas em lâminas apropriadas. As lâminas foram tratadas com IgG anti-camundongo, ligado à fluoresceína (Sigma). A quantificação é dada em relação a maior diluição onde foi observada fluorescência uniforme na membrana do parasita (titulação do conjugado). Foram considerados positivos os resultados com titulações acima de 1:40.
- **ESTUDO HISTOPATOLÓGICO** - Os animais de todos os subgrupos experimentais que sobreviveram ao tratamento foram sacrificados e fragmentos do coração e músculo esquelético foram fixados em formol Milloning, incluídos em parafina para obtenção de secções de 5µm e corados em hematoxilina e eosina (HE) para estudo histopatológico.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram aplicados os testes de Mann-Whitney ou Wilcoxon para comparar a parasitemia e mortalidade cumulativa entre os grupos tratados com benzonidazol e a combinação de benzonidazol com alopurinol. Foram considerados significantes os valores de  $p \leq 0,05$ .

## **CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

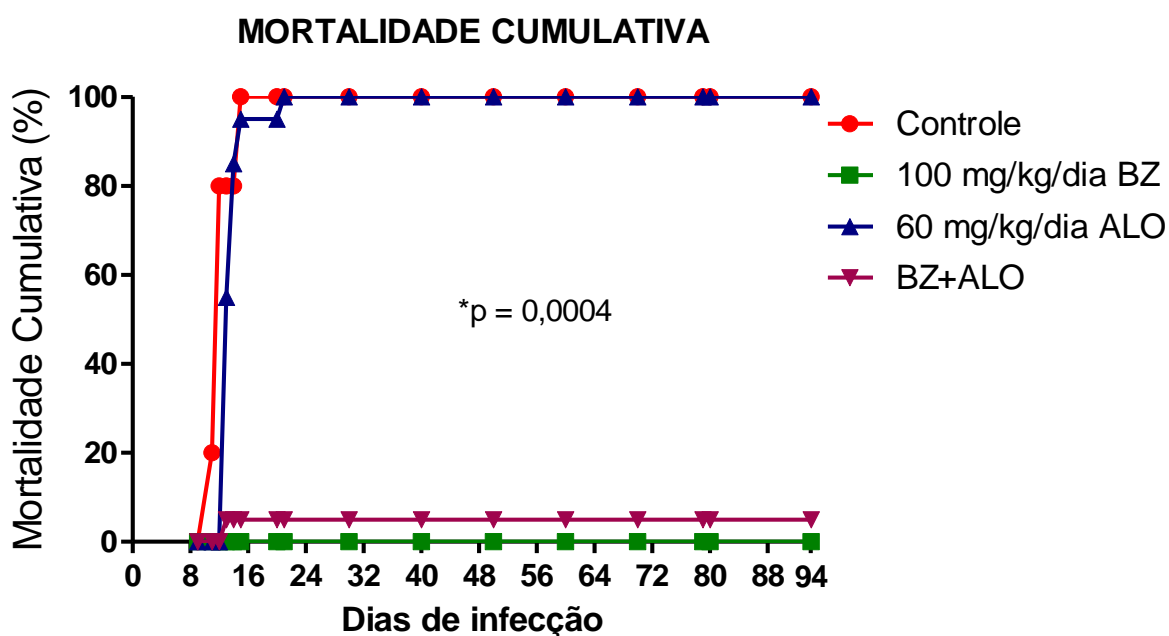
O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comissão de Ética no uso de animais de Laboratório (CEUA) do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz-CPqGM/Fiocruz/BA, número do protocolo 04/2010 (vide anexo I). Todas as atividades relacionadas ao uso e manipulação desses animais estão de acordo com as normas éticas exigidas pela CEUA.



## V – RESULTADOS

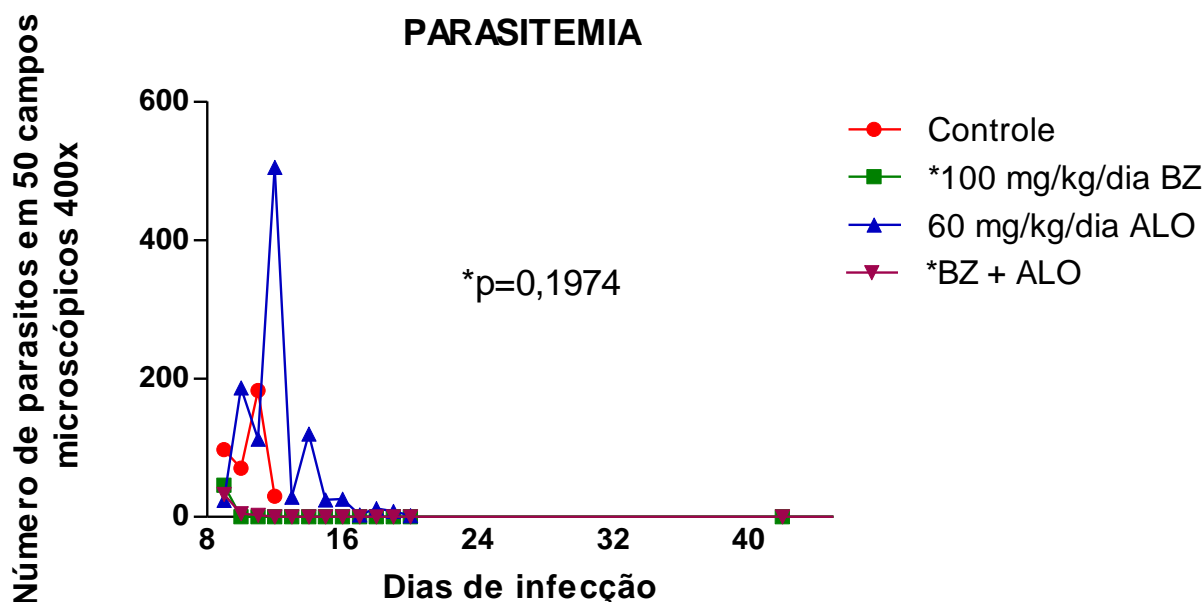
### MORTALIDADE E PARASITEMIA

Como mostra a figura 1, os camundongos do grupo controle chegaram ao óbito em 100% dos casos no 15º dia pós infecção e os camundongos do grupo tratado com alopurinol morreram em uma taxa de 100% no 21º dia pós infecção. No grupo tratado com a combinação de alopurinol com benzonidazol foi registrado somente um óbito durante o tratamento, indicando uma mortalidade de apenas 5,26%. No grupo tratado somente com benzonidazol todos os 5 camundongos sobreviveram até o final do tratamento. Um animal do grupo II e quatro animais do grupo IV morreram após o tratamento e não foram incluídas no gráfico da mortalidade. As taxas de mortalidade mostraram aumento significativo da sobrevivência do grupo tratado com a combinação da droga em relação ao grupo tratado com a monoterapia do benzonidazol ( $p = 0,0004$ ).



**GRÁFICO 1.** Mortalidade Cumulativa (%) em camundongos infectados com a cepa Y do T. cruzi e submetidos ao tratamento com benzonidazol (BZ) e/ou alopurinol (ALO) (\*Teste Wilcoxon;  $p < 0,05$ ; comparação do grupo BZ vs BZ + ALO).

O pico parasitêmico do grupo controle foi observado no 11º dia de infecção, com carga parasitária média de 182,75 parasitos em 50 campos microscópicos. No caso do grupo tratado com alopurinol o pico parasitário foi de 490,3 parasitos em 50 campos microscópicos, observado no 12º dia da infecção. Os grupos tratados com benzonidazol e sua associação com alopurinol não apresentaram um pico parasitêmico pois tiveram sua carga negativa logo no 10º dia pós infecção e mantiveram-se assim até o final do tratamento. Os camundongos do grupo tratado com alopurinol alcançaram um pico parasitêmico maior, o que reflete, quantitativamente, um número superior de parasitos na corrente sanguínea no período de tempo observado (**Gráfico 2**). Não houve diferença estatística entre as parasitemias observadas nos grupos tratados somente com benzonidazol e sua combinação com o alopurinol ( $p = 0,1974$ ).



**GRÁFICO 2.** Níveis parasitêmicos em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e submetidos ao tratamento com benzonidazol (BZ) e/ou alopurinol (ALO) (\*Teste Mann Whitney;  $p < 0,05$ ; comparação do grupo BZ vs BZ + ALO).

## TESTES DE CURA

Somente os camundongos tratados com benzonidazol ou sua associação sobreviveram a todo o tratamento, portanto esses dois grupos foram submetidos a todos os testes de cura propostos. A parasitemia após as injeções de ciclofosfamida se manteve negativa em todos os camundongos. O xenodiagnóstico realizado em seguida também constatou a negatividade parasitológica de todos os camundongos. No teste sorológico, titulações superiores a 1:40 foram observadas somente em 2 camundongos do grupo tratado com benzonidazol, indicando positividade sorológica, e em nenhum dos camundongos do grupo tratado com a associação dos fármacos. As **Tabelas 1 e 2** apresentam os resultados de todos os testes de cura realizados nos camundongos que sobreviveram ao tratamento.

**TABELA 1.** Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ).

Código	Parasitológico			Sorológico
	Imunossupressão	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI – Títulos
BZ1	NEG	NEG	NEG	1:320
BZ2	NEG	NEG	NEG	1:320
BZ3	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ4	NEG	NEG	NEG	NEG
BZ5	NEG	*	*	*

\*Óbito

**TABELA 2.** Resultados dos testes de cura parasitológico e sorológico de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol e 60mg/kg/dia de alopurinol (BZ + ALO).

Código	Parasitológico			Sorológico
	Imunossupressão	Xenodiagnóstico	Hemocultura	IFI – Títulos
BZ+ALO1	NEG	NEG	*	*
BZ+ALO2	NEG	NEG	NEG	NEG
BZ+ALO3	NEG	NEG	NEG	NEG
BZ+ALO4	NEG	NEG	NEG	NEG
BZ+ALO5	NEG	NEG	NEG	NEG
BZ+ALO6	NEG	NEG	*	*
BZ+ALO7	NEG	NEG	NEG	1:20
BZ+ALO8	NEG	NEG	*	*
BZ+ALO9	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ+ALO10	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ+ALO11	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ+ALO12	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ+ALO13	NEG	NEG	NEG	1:20
BZ+ALO14	NEG	NEG	NEG	NEG
BZ+ALO15	NEG	NEG	NEG	1:10
BZ+ALO16	NEG	NEG	*	*
BZ+ALO17	NEG	NEG	NEG	NEG
BZ+ALO18	*	*	*	*
BZ+ALO19	*	*	*	*

\*Óbito

Ao final de todos os testes de cura, foi observado cura parasitológica e sorológica em todos os camundongos tratados com benzonidazol e alopurinol associados, apresentando um índice de cura de 100% dos camundongos. Já no grupo tratado com benzonidazol, houve cura parasitológica em todos os camundongos, no entanto dois animais apresentaram-se positivos sorologicamente, portanto,

houve um índice de cura de 60% dos camundongos. Essas relações podem ser visualizadas na

**Tabela 3.**

**TABELA 3.** Índices de cura, de camundongos suíços infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 100 mg/kg/dia de benzonidazol (BZ) e benzonidazol em combinação com alopurinol (BZ + ALO) baseado na combinação dos testes parasitológicos e sorológicos.

<b>Grupo</b>	<b>Positivos/total</b>	<b>Índice de cura</b>
BZ	2/5	60%
BZ+ALO	0/17	100%

## ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

**Grupo I** - Os camundongos controles da fase aguda da infecção pela cepa Y do *T. cruzi* não submetidos ao tratamento não sobreviveram à infecção e devido à elevada mortalidade não foram utilizados no estudo histopatológico.

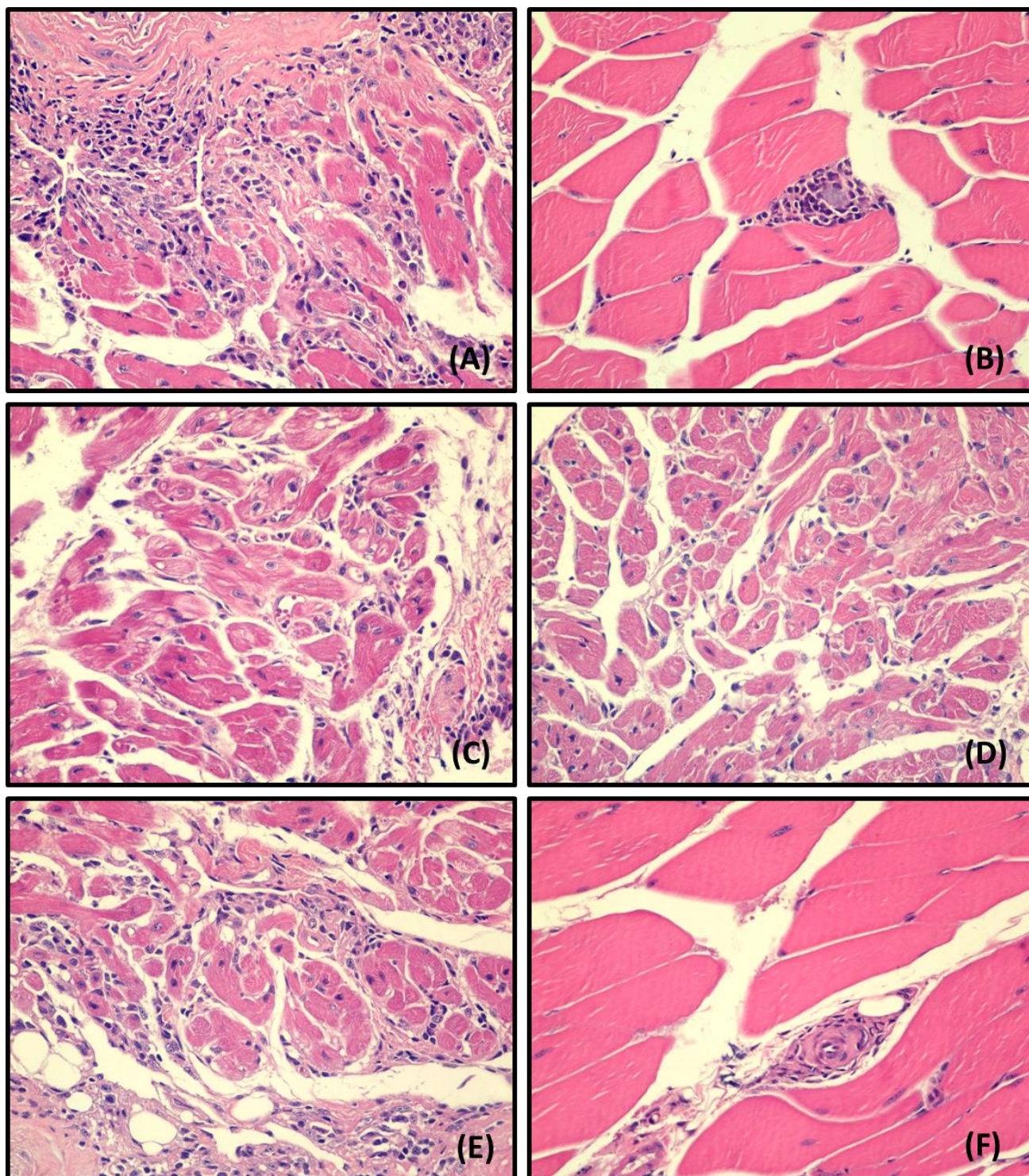
**Grupo II** - Nos camundongos infectados pela cepa Y e tratados somente com benzonidazol, o estudo histopatológico do miocárdio mostrou discreto infiltrado mononuclear em átrio e ventrículo e infiltrado difuso perivascular em ventrículo em 3 de 4 casos associados à presença de fibrose difusa moderada. Em músculo esquelético há infiltrado mononuclear intersticial, perivascular com discreta arteriolite focal. (**Figura 1**)

**Grupo III** - Como foi visto anteriormente, o tratamento com alopurinol não determinou a sobrevivência dos camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*.

**Grupo IV** - Foram analisados os dados histopatológicos em 13 camundongos que sobreviveram ao tratamento combinado do benzonidazol com alopurinol. O exame do coração mostrou ausência de atividades inflamatórias em 8/13 casos, presença de atividades inflamatórias discretas ou moderadas representadas por infiltrados mononucleares difusos e/ou focais em 5 casos no miocárdio e áreas

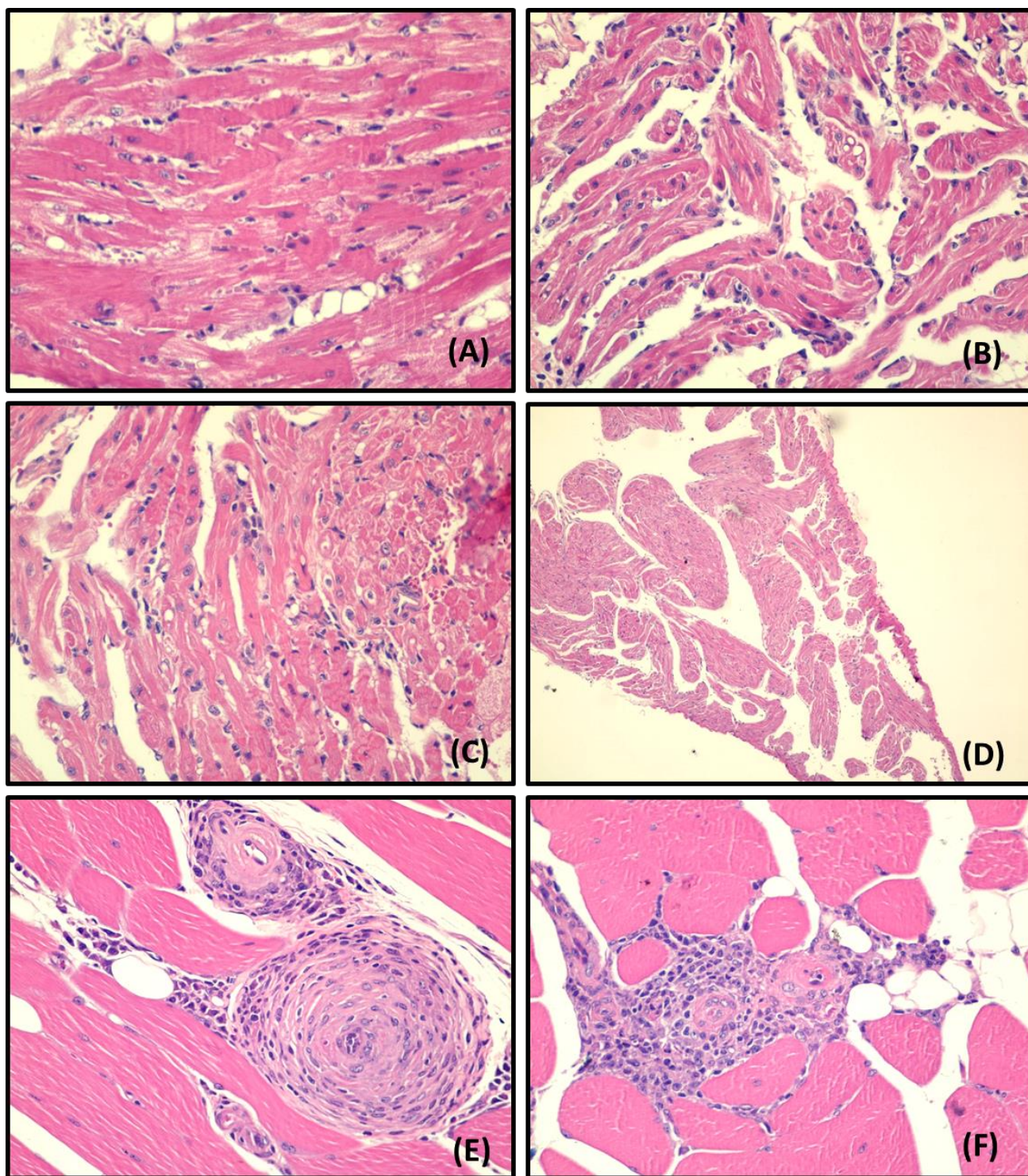


focais de degeneração hialina. O músculo esquelético apresentou arterite focal intersticial discreta em 02 casos. (Figura 2)



**FIGURA 1.** Secção de tecidos de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com benznidazol em coloração HE. **A)** Secção do miocárdio evidenciando infiltrado difuso perivascular em ventrículo - 400x. **B)** Secção de músculo esquelético apresentando infiltrado focal - 400x. **C)** Secção de miocárdio com infiltrado difuso em átrio - 400x. **D)** Secção de miocárdio com infiltrado difuso intersticial em átrio - 400x. **E)** Secção de miocárdio apresentando infiltrado difuso e fibrose intersticial difusa em ventrículo - 400x. **F)** Secção de músculo esquelético com arteriolite focal - 400x.





**FIGURA 2.** Secção de tecidos de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* e tratados com benznidazol e alopurinol em coloração HE. **A)** Secção de miocárdio apresentando áreas com degeneração hialina e infiltrado difuso - 400x **B)** secção de miocárdio com infiltrado difuso em átrio - 400x **C)** Secção de miocárdio com área de infiltrado difuso em ventrículo - 400x **D)** Secção de miocárdio com vista geral de átrio sem alterações - 100x **E)** Secção de músculo esquelético apresentando arteriolite em vasos intersticiais com espessamento da camada média e oclusão da luz - 400x **F)** Secção de músculo esquelético com Arterite focal - 400x.

## VI- DISCUSSÃO

Descoberta há mais de 100 anos, a doença de Chagas continua sendo um grande problema de saúde pública em toda a América Latina e o benzonidazol, a única droga atualmente em uso clínico no Brasil. Apesar de não haver nenhum outro fármaco capaz de substituí-lo no tratamento dessa enfermidade, o uso combinado com outras drogas pode significar uma redução da sua toxicidade ao organismo<sup>1,2,10</sup>. Observando os resultados do presente estudo, podemos sugerir o alopurinol como uma possível droga de escolha para essa associação, requerendo, no entanto, novos estudos.

A cepa Y, de alta susceptibilidade ao tratamento com benzonidazol, apresenta alta virulência e um pico parasitêmico precoce, resultando em uma alta mortalidade<sup>16</sup>. Nos grupos controle e tratados apenas com alopurinol observamos mortalidade de 100%, mostrando a baixa eficácia dessa droga usada isoladamente em camundongos infectados com a cepa Y, enquanto os grupos tratados somente com benzonidazol ou com a combinação das drogas atingiram um elevado índice de sobrevivência. Portanto o uso do benzonidazol foi um fator determinante na sobrevivência dos animais envolvidos nesse estudo. Além disso, o grupo do alopurinol apresentou um maior pico parasitêmico que o grupo controle, corroborando os estudos que demonstram a ineficácia do alopurinol como monoterapia na fase aguda da doença de Chagas<sup>17</sup>.

Nos testes parasitológicos, observou-se negatificação da parasitemia em 100% dos animais tratados com benzonidazol ou sua associação, no entanto, na análise do teste sorológico pelo método de imunofluorescência indireta houve uma mudança nesse padrão. Estudos prévios do mesmo laboratório do presente estudo demonstraram que a sorologia em animais tratados e curados poderia persistir positiva devido à presença de antígenos parasitários sequestrados nas células dentríticas foliculares do baço. Estes antígenos são responsáveis pela manutenção da memória imunológica, na resposta humoral<sup>18,19</sup>. O índice de cura de 100% observado no grupo da combinação dos fármacos significa o desaparecimento do estímulo parasitário para produção de anticorpos, enquanto a positividade do teste observada em 40% dos animais do grupo tratado somente com benzonidazol demonstra a persistência de estímulos antigênicos. Com esse achado pode-se sugerir que, ainda que a



monoterapia com alopurinol não seja eficaz para controle parasitário da doença de Chagas na fase aguda e a quimioterapia isolada com benzonidazol possa apresentar taxa considerável de falha terapêutica, a associação dos dois fármacos pode ser importante para aumentar a taxa de cura. Além disso, estudos demonstram a baixa toxicidade do alopurinol no tratamento da doença de Chagas, inclusive sendo empregado em casos de transplante de coração com reativação da infecção durante a imunossupressão pós cirúrgica<sup>10</sup>.

A detecção de elevados títulos de anticorpos mesmo em camundongos nos quais a parasitemia após a imunossupressão, o xenodiagnóstico e a hemocultura se mostravam negativos indica a melhor capacidade da imunofluorescência indireta em ser usada como teste de cura. Assim, os resultados dos testes utilizados no presente trabalho concordam com estudos que comprovam a maior sensibilidade dos testes sorológicos em detrimento dos testes parasitológicos<sup>20</sup>.

Proporcionalmente, os camundongos tratados somente com benzonidazol desenvolveram uma maior ocorrência de infiltrados inflamatórios, caracterizada por presença de células mononucleares. A combinação do benzonidazol com alopurinol determinou nítida diminuição das lesões inflamatórias e degenerativas do miocárdio do músculo esquelético em camundongos na fase crônica da infecção pela cepa Y do *T. cruzi*.

Apesar da monoterapia com alopurinol não apresentar um comportamento curativo durante a fase aguda da doença de Chagas, o uso em combinação com o benzonidazol indicou um menor grau de lesão tissular se comparada à monoterapia com o benzonidazol, demonstrando a capacidade da associação em diminuir o grau de lesão de tecidos dos animais. Sua baixa toxicidade e comportamento favorável, reduzindo as lesões tissulares quando associado ao benzonidazol, justificam a realização de novos estudos com o intuito de diminuir a dosagem empregada do benzonidazol visando a manutenção de bons resultados associados à diminuição dos efeitos colaterais do tratamento ao organismo do hospedeiro vertebrado<sup>10</sup>.

Ao serem utilizadas na terapia combinada da doença de Chagas as mesmas dosagens padronizadas para a monoterapia em estudos prévios, não podemos afirmar que a cura observada na combinação do benzonidazol com o alopurinol se deu devido à atuação das duas drogas, uma vez que

a dosagem aplicada de benzonidazol era suficiente para a cura parasitológica em monoterapia<sup>17</sup>. No entanto, a divergência entre os resultados dos testes de cura parasitológicos e sorológicos apontam para a necessidade de novos experimentos empregando dosagens inferiores das drogas para melhor avaliar a efetividade da terapia combinada de alopurinol e benzonidazol.

## VII - CONCLUSÕES

- 1) Os resultados do tratamento com benzonidazol associado ao alopurinol mostraram a eficácia curativa da quimioterapia combinada e nítida diminuição das lesões em miocárdio e músculo esquelético.
- 2) Isoladamente, o alopurinol não teve efeito terapêutico na fase aguda, apresentando 100% de mortalidade do grupo. A monoterapia com benzonidazol por sua vez determinou sobrevida em 100% dos animais do grupo, além de 100% de negatificação parasitológica e 60% de negatificação sorológica.
- 3) A terapia combinada apresentou um maior índice de cura que a administração isolada dos fármacos. Houve cura parasitológica e sorológica em 100% dos camundongos.
- 4) O grupo da combinação de benzonidazol e alopurinol apresentou lesões do miocárdio e músculo esquelético mais discretas quando comparadas ao grupo da monoterapia com benzonidazol.
- 5) O teste de imunofluorescência indireta mostrou-se mais sensível se comparado aos testes parasitológicos empregados no estudo.

## VIII - SUMMARY

### **EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY: COMBINATION OF BENZNIDAZOLE WITH ALLOPURINOL IN MICE INFECTED BY THE Y STRAIN OF *TRYPANOSOMA CRUZI* DURING THE ACUTE PHASE OF CHAGAS DISEASE.**

**Introduction:** Chagas disease is a anthropozoonosis caused by the flagellate protozoan *Trypanosoma cruzi*. In Brazil, benznidazole is the only available drug for the specific treatment of the disease. Combining other drugs with benznidazole may be a new therapeutic strategy for Chagas disease. **Objective:** To evaluate the treatment effect of benznidazole associated with allopurinol over the course of infection by the Y strain of *T. cruzi* in swiss mice during the acute phase of Chagas disease. **Methods:** Experimental study using 49 swiss albino mice, not isogenic and both sexes. They were divided into 4 groups: I - control infected and untreated; II - Treated 100mg/kg/d of benznidazole; III - Treated with allopurinol 60mg/kg/day; IV - Treated with benznidazole + allopurinol. Treatment was initiated on the 9th day post-infection and were administered 60 doses of medication. The parasitemia and mortality were monitored daily. 60 days after the end of treatment the following tests of cure were performed: xenodiagnosis, parasitemia, blood culture, indirect immunofluorescence and histopathological analysis of heart and skeletal muscle. **Results:** There was 100% mortality of mice in groups I and III, 5.26% in the IV group and 0% in group II. Tests of cure showed parasitological cure in 100% of camungondos in groups II and IV and serological cure in 60% of group II and group IV 100%. The histopathological analysis showed lower degree of tissue injury in mice treated with the combination of drugs. **Discussion:** Although the allopurinol monotherapy is not effective for parasite control of Chagas disease in the acute phase, its association with benznidazole may be important to increase the cure rate and decrease the tissue damage found in heart and skeletal muscle in chronic phase disease. **Conclusion:** The results of treatment of benznidazole associated with allopurinol showed the curative efficacy of combined chemotherapy and sharp decrease in lesions in cardiac and skeletal muscle.

**Keywords:** Chagas Disease, Chemotherapy, Allopurinol, benznidazole, *Trypanosoma cruzi*.

## IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferreira MS, Lopes ER, Silva AM, Andrade ZA, Dias JC, Ostermayer AL. Doença de Chagas. In: Veronesi R, Focaccia R. Tratado de Infectologia. 4. ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2010. p. 1633-75.
2. Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. *Acta Trop* 2010 Jul-Aug;115(1-2):55-68.
3. Dias JCP. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. *Cad Saúde Pública* 2007;23( Suppl 1 ):S13-S22.
4. Oliveira MF, Dias ATN, Pontes VMO, Souza Junior AS, Coelho HL, Coelho ICB. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. *Rev Pat Trop* 2008;37(3):209-28.
5. Araújo MSS, Martins-Filho AO, Pereira MÊS, Brener Z. A combination of benzonidazole and ketoconazole enhances efficacy of chemotherapy of experimental Chagas disease. *J Antimicrob Chemother* 2000;45(6):819-24.
6. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. *Rev Soc Bras Med Trop* 2012 June;45(3):286-96.
7. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (Brasil). Consenso brasileiro em doença de Chagas. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005;38(supl.3):1-29.
8. Brener Z. Terapêutica Experimental na Doença de Chagas. In: Andrade ZA; Brener Z; Barral Netto. M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p. 379-88.
9. Coura JR, Castro SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002 Jan;97(1):3-24.
10. Coura JR. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy - a proposal. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009 Jul;104(4):549-54.

11. Avila JL, Avila A e Munoy E. Effect of allopurinol on different strains of *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg 1981 Jul; 30:769-74.
12. Marr JJ. Purine metabolism in *T. cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1981 Jul;3(3):187-96.
13. Avila JL, Avila A. *Trypanosoma cruzi*: allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas' disease. Exp Parasitol 1981;51(2):204-8.
14. Apt W, Aguilera X, Arribada A, Pérez C, Miranda C, Sánchez G, Zulantay I, Cortés P, Rodriguez J, Juri D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. Am J Trop Med Hyg 1998;59(1):133-8.
15. Andrade SG, Figueira RM. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro-7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop 1977;19(1):335-41.
16. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *T. cruzi* strains of different types. Bull World Health Organ 1985;63(4):721-6.
17. Cançado JR. Criteria of Chagas disease cure. Mem Inst Oswaldo Cruz 1990;94(Suppl.1): 331-5.
18. Andrade SG, Pimentel AR, Souza MM, Andrade ZA. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. Am J Trop Med Hyg 2000;63:64-70.
19. Andrade SG, Freitas LAR, Peyrol S, Pimentel AR, Sadigursky M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* reveals infection persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. Bull World Health Organ 1991;69:191-9.
20. Lauria-Pires L, Castro CN, et al. Inefectividade of allopurinol in patients in the acute phase of Chagas disease. Rev Soc Bras Med Trop 1988;21(2):79.

## X - ANEXOS

## ANEXO I - Parecer da comissão de ética no uso de animais do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

PROTOCOLO: 004/2010

PROJETO: "Avaliação da associação do quimioterápico benzonidazol a outros fármacos com ação anti-*T. cruzi* no tratamento da doença de Chagas experimental."

COORDENADOR: Dra. Sonia Gumes Andrade

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem	Nº de Animais
Camundongos Sulços	450

Certificamos que na presente versão este projeto está de acordo com os princípios de ética na pesquisa com animais adotado pela Lei 11.784/2008, foi aprovado e licenciado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-CPqGM) em 19/04/2010, e tem validade até 19/04/2012.

The present version of the above referenced project agrees with the ETHICAL PRINCIPLES IN ANIMAL RESEARCH adopted by the Brazilian law 11.784/2008 and was approved and licensed by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of the CPqGM-FIOCRUZ at 04/19/2010, being valid until 04/19/2012.

Salvador, 19 de abril de 2010.

---

**Dr. Manoel Barral-Netto**

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz - FIOCRUZ