

ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE A AÇÃO TERAPÊUTICA DA DROGA Ro 7-1051 NA INFECÇÃO POR DIFERENTES CEPAS DO TRYPANOSOMA CRUZI

Sonia G. ANDRADE (1) e Rozália M. FIGUEIRA (2)

RESUMO

JBZ
Tratando-se camundongos infectados pela cepa **Peruana** e pela cepa **Colombiana** do **T. cruzi** com o Ro 7-1051 (N-benzil-2-nitro-imidazolacetamida) observou-se nítida diferença da resposta ao tratamento nos dois grupos, sendo o índice de cura parasitológica de 87% na infecção pela cepa **Peruana** e de apenas 16,7% nos infectados com a cepa **Colombiana**. Verificou-se, entretanto, em ambos os grupos, destruição intracitoplasmática das formas amastigotas, negatificação parasitêmica em curto prazo, bem como nítida regressão das lesões teciduais nos animais tratados em relação aos não tratados. Tratando-se animais infectados pela mesma cepa, isolada de animais tratados e não curados observou-se resistência mais acentuada, o que sugere uma seleção de formas resistentes quando o tratamento não leva à cura parasitológica. Tendo em vista os resultados do tratamento em relação à parasitemia e à regressão das lesões teciduais conclui-se que há nítida vantagem em se instituir o tratamento precoce da doença, investigando-se entretanto, a suscetibilidade da cepa do **T. cruzi**, antes de serem instituídos os esquemas terapêuticos.

INTRODUÇÃO

O composto imidazólico Ro 7-1051 (N-benzil-2-nitro-imidazolacetamida), recentemente aplicado ao tratamento da doença de Chagas^{8,9,12}, mostrou, em triagem inicial em camundongos feita pelo Laboratório de origem¹³, elevada atividade terapêutica e baixa toxicidade.

Como foi demonstrado em trabalho anterior³, em relação ao Bay 2502, a resposta ao tratamento pode ser influenciada pela cepa do parasito. Também foi verificada maior resistência dos parasitos isolados de animais previamente tratados com a mesma droga⁴.

Deste modo, procurou-se verificar em relação ao Ro 7-1051 a resposta ao tratamento da infecção experimental por duas cepas diferentes do **Trypanosoma cruzi**, a possibilidade

de obtenção de cura parasitológica por tratamento prolongado e o grau de resistência dos parasitos isolados de animais tratados. Levou-se em conta neste estudo a resposta da parasitemia, a evolução das lesões teciduais e a influência da fase da infecção em que se iniciou o tratamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Generalidades: foram utilizados camundongos brancos de linhagem não determinada, pesando 18 a 20 g (Grupos I e II) ou 10 a 12 g (Grupo III) mantidos em dieta padrão "ad libitum".

Cepas utilizadas: Cepa **Peruana**^{2,10}, que determina no camundongo infecção de curso rapidamente fatal e cepa **Colombiana**^{2,7}, que determina infecção de curso lento e progressi-

Trabalho realizado com o Auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 6213/75

- (1) Professor Assistente da Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil
(2) Biologista do Laboratório Central Gonçalo Moniz

vo. Ambas as cepas vêm sendo mantidas em laboratório por passagens sucessivas em camundongo.

Inóculos: sangue citratado de camundongos infectados obtidos de acordo com técnica já descrita²; o cálculo do número de tripomastigotas foi feito de acordo com o método de PIZZI & PRAGER¹¹ modificado por BRENER⁵. Inoculações por via intraperitoneal no volume de 0,2 ml.

Grupos experimentais: **Grupo I** — Tratamento da infecção pela cepa **Peruana** do *T. cruzi*. O tratamento foi iniciado na fase precoce (3.º dia) e na fase avançada da infecção (7.º dia). **Grupo II** — Tratamento da infecção pela cepa **Colombiana** do *T. cruzi*, iniciado na fase precoce (6.º dia) e na fase avançada (27.º dia) da infecção. Os dados gerais referentes aos Grupos I e II estão expressos na Tabela I. **Grupo III** — Estudo sobre a resistência adquirida: tratamento de camundongos infectados com a cepa **Colombiana**, isolada de

animais tratados, durante período prolongado, pelo Ro 7-1051. Os animais deste grupo foram inoculados com o sangue de 10 camundongos do Grupo II, previamente tratados e não curados, sendo que, de cada animal doador se obteve o inóculo para 5 camundongos de 10 a 12 g, num total de 50 camundongos. Foram inoculados ainda 10 camundongos controles com sangue de animais do Grupo II não submetidos a tratamento. De cada grupo de 5 animais inoculados, 3 foram tratados e 2 serviram de controles do tratamento. Outros dados constam da Tabela II.

Esquema terapêutico: a droga empregada foi o Ro 7-1051 (N-benzil-2-nitro-imidazolacetamida) em suspensão, em solução aquosa de goma-arábica a 4% administrada por entubação esofágica em 5 doses semanais consecutivas de 100 mg/kg/dia, de acordo com método preconizado pelo Laboratório de origem¹³. A duração do tratamento e o número de doses para cada grupo experimental constam das Tabelas I e II.

TABELA I

Dados gerais sobre o tratamento da infecção pelas cepas **Peruana** e **Colombiana** do *T. cruzi* com o Ro 7-1051

Cepas de <i>T. cruzi</i>	Grupos experimentais	Inóculos Nº tripomast. (0,2 ml)	Nº animais	Tratamento (*)		
				Início (dias/infecção)	Duração (dias)	Nº doses
Peruana	A	248.000	20	3º	126	87
	B		20	7º	122	83
	C		20	Não trat.	—	—
Colombiana	A	390.000	30	6º	200	125
	B		30	27º	180	112
	C		20	Não trat.	—	—

(*) Esquema terapêutico: 100 mg/kg/dia, 5 doses semanais consecutivas

TABELA II

Tratamento pelo Ro 7-1051 da infecção por cepa **Colombiana** isolada de animais tratados (Dados gerais)

Cepa do <i>T. cruzi</i>	Grupos experimentais	Nº de animais			Tratamento		
		Tratados	Controles	Total	Início	Duração	Doses
Colombiana	1 — Inoculação c/sangue de animais tratados (*)	30	20	50	19º	40 dias	30
	2 — Inoculação c/sangue de controles (*)	6	4	10	19º	40 dias	30

(*) Inóculos: 12.000 tripomastigotas em 0,2 ml

Métodos para avaliação dos resultados

1) **Resposta da parasitemia ao tratamento**, pela contagem diária do número de formas tripomastigotas no sangue periférico obtido por secção da cauda, em gota padronizada, entre lâmina e lamínula, sendo a avaliação feita em 50 campos microscópicos de 400 X.

2) **Testes de cura** — nos animais em que a parasitemia era persistentemente negativa, realizou-se xenodiagnóstico com 5 ninfas de *R. prolixus*, subinoculação do sangue destes animais em camundongos recém-nascidos e estudo histopatológico dos diversos órgãos para pesquisas de formas amastigotas.

3) **Estudo histopatológico** — os animais dos Grupos I e II foram sacrificados durante o curso do tratamento, nos seguintes períodos: 24 e 48 horas, 7, 14, 20 e 30 dias após o início do tratamento e no final do mesmo. Os diversos órgãos e tecidos foram fixados em formol a 10% e, após inclusão em parafina foram feitos cortes corados em hematoxilina e eosina.

4) **Avaliação da mortalidade** — calculou-se a porcentagem dos animais que morreram espontaneamente durante o curso da infecção, excluindo-se os que morreram acidentalmente ou foram sacrificados.

RESULTADOS

I — Tratamento dos animais dos Grupos I e II

1) **Efeito do tratamento sobre a parasitemia** — nos animais do Grupo I, infectados pela cepa **Peruana**, tanto nos tratados precocemente (3.º dia) como na fase avançada (6.º dia), observou-se negatificação parasitêmica 24 horas após o início do tratamento, permanecendo negativos até o final, quando foram submetidos aos testes de cura e sacrificados. Nos animais do Grupo II, infectados pela cepa **Colombiana**, o nível de parasitemia sofreu evidente redução após o início do tratamento, tanto nos tratados a partir do 6.º dia como a partir do 27.º dia, porém só houve negatificação após 7 e 10 dias de tratamento, respectivamente, como mostra a Fig. 1. Na fase final a parasitemia voltou a positivar na maioria dos animais, com níveis idênticos aos dos animais não tratados (Fig. 1).

2) **Índices de cura parasitológica** — nos animais do Grupo I, infectados pela cepa **Peruana**, o índice de cura foi de 87%, enquanto nos do Grupo II, infectados pela cepa **Colombiana**, foi de 16,7%.

3) **Índices de mortalidade** — os dados referentes à mortalidade, em ambos os grupos estão expressos na Tabela III.

TABELA III

Índice de mortalidade em animais tratados pelo Ro 7-1051 (Cepa **Peruana** e cepa **Colombiana**)

Grupos experimentais	Início do tratamento	Índices de mortalidade
I — Cepa Peruana	A 3º dia infecção	0
	B 7º dia infecção	20%
	C Controles não tratados	100% (*)
II — Cepa Colombiana	A 6º dia infecção	33%
	B 27º dia infecção	25%
	C Controles	55%

(*) Todos morreram até 10 dias de infecção

4) **Estudo histopatológico — Grupo I** — os controles de infecção pela cepa **Peruana**, mostraram até 10 dias, intenso parasitismo de células reticulares e de fibras miocárdicas, com focos de destruição do miocárdio e difuso infiltrado mononuclear. Nos animais tratados a partir do 3.º dia, não foram constatadas le-

sões teciduais. Nos tratados a partir do 6.º dia de infecção, examinados 48 horas após o início do tratamento, não foram vistos parasitos nos tecidos, porém havia infiltrado mononuclear difuso e focos de infiltração de polimorfonucleares em torno de fibras vacuolizadas (Fig. 2). Nos sacrificados no final do tratamento,

TERAPÊUTICA PELO RO-71051
NA INFECÇÃO CHAGÁSICA
EXPERIMENTAL-PARASITEMIAS
CEPA COLOMBIANA

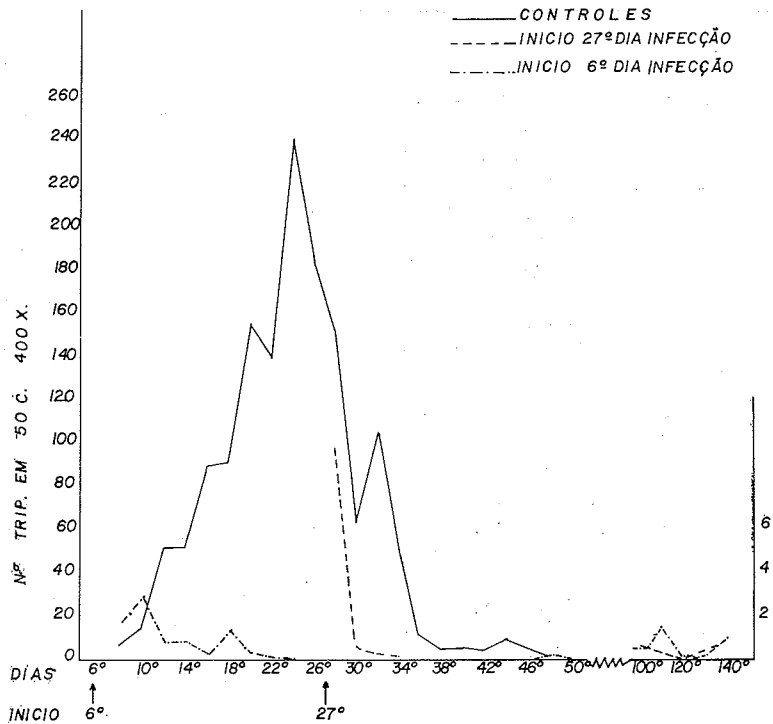


Fig. 1 — Níveis de parasitemia em camundongos tratados pelo Ro 7-1051 no 6º e no 27º dia de infecção em comparação com os controles não tratados. Houve nítido decréscimo nos tratados e negatificação parasitêmica. Na fase avançada a parasitemia voltou a positivar apesar do tratamento continuado.

porém não curados, foram vistos escassos parasitos e focos de infiltração mononuclear em músculo esquelético e miocárdio. Naqueles cujos testes comprovaram cura parasitológica, não foram encontradas lesões histopatológicas.

Grupo II — os animais controles de infecção pela cepa **Colombiana**, examinados até 30 dias, mostraram intenso parasitismo de músculo esquelético e de miocárdio, com destruição de fibras parasitadas e denso infiltrado mononuclear (Fig. 3). Os tratados a partir do 6.º dia não apresentaram lesões histopatológicas até 30 dias após o início do tratamento, enquanto naqueles tratados a partir do 27.º dia de infecção, observou-se desintegração de formas amastigotas no interior de fibras mus-

culares, 24 horas após o início do tratamento (Fig. 4); após 48 horas, foram vistas fibras vacuolizadas, sem parasitos, tendo em torno infiltrado de polimorfonucleares, além de difuso infiltrado mononuclear (Fig. 5). O exame a partir de 7 dias de tratamento, mostrou regressão do infiltrado inflamatório. Nos animais sacrificados no final do tratamento, não curados, havia raras formas amastigotas em músculo esquelético e discreto infiltrado linfoplasmocitário, em geral perivascular, ou em torno de fibras destruídas. Os controles não tratados, que sobreviveram até o final do experimento, apresentavam acentuada miosite crônica, com difuso infiltrado mononuclear intersticial, focos de destruição de fibras musculares e escassos parasitos.

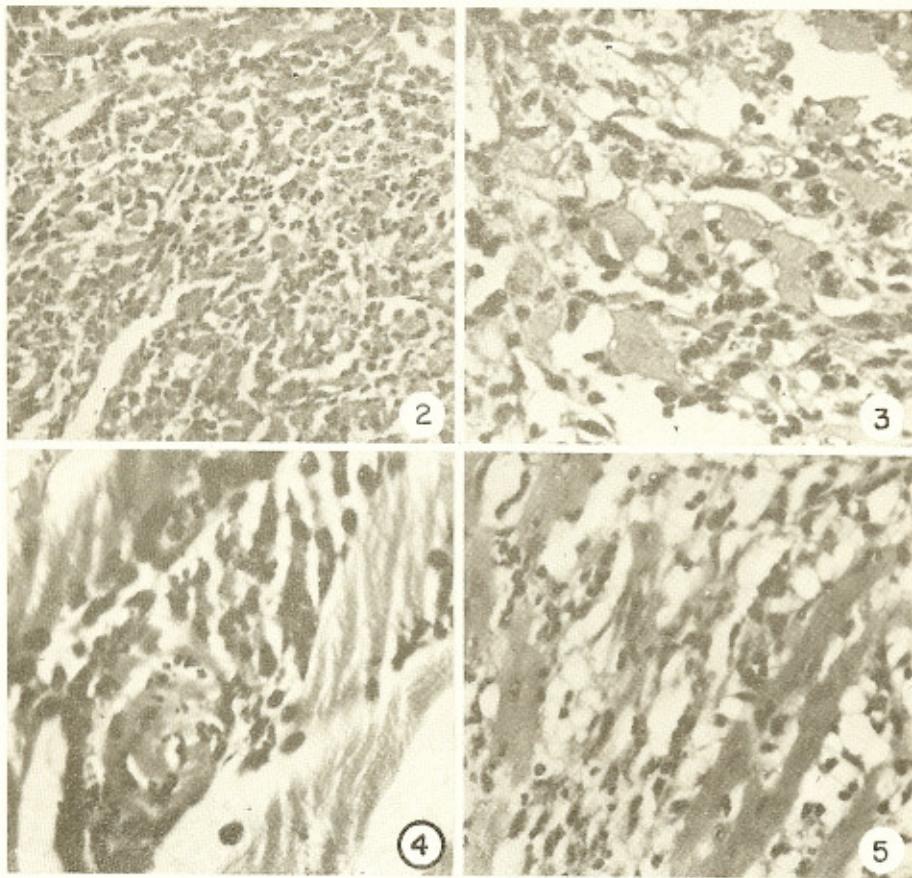


Fig. 2 — Infecção pela cepa **Peruana** — aspecto microscópico do coração 48 horas após o início do tratamento pelo Ro 7-1051: ausência de parasitos, difuso infiltrado mononuclear e focos de infiltração de polimorfonucleares em torno de fibras miocárdicas vacuolizadas. H.E., 100 X. Fig. 3 — Secção de miocárdio em camundongo controle no 26º dia de infecção pela cepa **Colombiana** observando-se numerosas formas amastigotas no interior de fibras cardíacas, ao lado de fibras vacuolizadas e difuso infiltrado mononuclear. H.E., 200 X. Fig. 4 — Tratamento pelo Ro 7-1051 iniciado no 26º dia de infecção pela cepa **Colombiana**: 24 horas após o início do tratamento observa-se destruição intracitoplasmática de formas amastigotas, com necrose da fibra muscular e infiltrado de polimorfonucleares. H.E., 200 X. Fig. 5 — Intensa vacuolização de fibras cardíacas e presença de infiltrado de mononucleares e de polimorfonucleares. 48 horas após o início do tratamento, em animais no 26º dia de infecção pela cepa **Colombiana**. Ausência de formas amastigotas. H.E., 200 X

II — Avaliação da resistência da cepa Colombiana quando isolada de animais previamente tratados, (Grupo III)

Nos 10 grupos de 5 animais inoculados individualmente com sangue de camundongos tratados e não curados, observou-se decréscimo dos níveis de parasitemia dos animais tratados, quando comparados com os não tratados, do mesmo grupo, porém não foi observada negatificação da parasitemia durante todo o

curso do tratamento de 40 dias de duração (Fig. 6). Nos controles infectados com sangue de animais não tratados, observou-se resposta idêntica à referida no Grupo II, isto é, decréscimo nítido e imediato da parasitemia após o início do tratamento, com negatificação em curto prazo.

Cura parasitológica e índice de mortalidade — não foram avaliados neste grupo em virtude da curta duração do tratamento.

RESPOSTA À TERAPÊUTICA PELO RO 7-1051
INFECÇÃO POR TRIPOMAST. ISOLADOS DE
ANIMAIS TRATADOS. CEPA COLOMBIANA
PARASITEMIAS

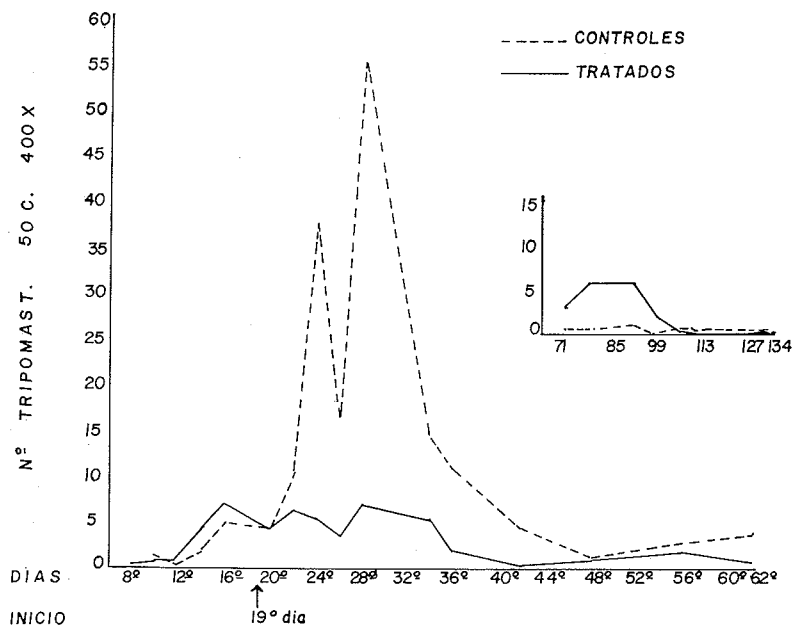


Fig. 6 — Resposta ao tratamento pelo Ro 7-1051 da infecção por tripomastigotas isolados de animais previamente tratados: os níveis parasitemicos sofreram nitida redução, porém não há negatização até o final do tratamento.

COMENTÁRIOS

Nosso trabalho vem confirmar a ação parasiticida contra o *Trypanosoma cruzi* do composto Ro 7-1051, que determina inclusive destruição das formas amastigotas intracelulares. O resultado foi bem significativo em relação à cepa **Peruana**, determinando índice de 87% de cura parasitológica, porém menos promissor em relação à cepa **Colombiana**, que se mostrou nitidamente mais resistente, com apenas 16,7% de cura parasitológica, observando-se inclusive, maior resistência ao tratamento, da cepa re-isolada desses animais tratados e não curados. Resultados semelhantes foram obtidos anteriormente em relação a estas mesmas cepas, com o Bay 2502³. Os índices de cura obtidos com o Ro 7-1051 foram mais elevados do que os observados com o Bay 2502³, não só em relação à cepa **Peruana** como à **Co-**

lombiana; a cepa **Colombiana** se mostrou mais resistente do que a **Peruana** tanto ao tratamento pelo derivado furfurilidênico (Bay 2502) como ao derivado imidazólico (Ro 7-1051) o que parece indicar um fator dependente da própria cepa. As duas cepas em estudo pertencem a tipos diferentes¹, predominando na cepa **Peruana** as formas delgadas e nítido retículo-tropismo na fase inicial da infecção. Sendo as formas delgadas mais suscetíveis aos fatores imunológicos do hospedeiro⁶, também poderiam ser mais vulneráveis à ação dos quimioterápicos, o que explicaria a precoce e acentuada resposta que se obtém quando o tratamento é aplicado a uma cepa em que predominam as formas delgadas. A destruição seletiva inicial de formas parasitárias suscetíveis, permitindo a multiplicação posterior das formas mais resistentes, explicaria o desenvolvimento de acentuado grau de resistência ad-

quirida, naqueles parasitos previamente expostos aos quimioterápicos, como foi visto em trabalho anterior em relação ao Bay 2502⁴ e no presente trabalho em relação ao Ro 7-1051.

As lesões teciduais nos animais tratados, mesmo quando não curados, foram nitidamente menos acentuadas do que as observadas nos controles não tratados, estando mesmo ausentes quando o tratamento foi instituído precocemente e nos casos de cura parasitológica. Há, pois, nítidas vantagens em se instituir o tratamento específico da doença, principalmente na fase precoce. Deve-se levar em conta, entretanto, a suscetibilidade da cepa a determinado quimioterápico, principalmente pela possibilidade de que os casos não curados possam vir a ser portadores de cepas ainda mais resistentes.

S U M M A R Y

Experimental study on the chemotherapeutic action of Ro 7-1051 in mice infected by different strains of *Trypanosoma cruzi*

Two groups of mice infected either with Peruvian or Colombian strains of *Trypanosoma cruzi* were treated with the drug Ro 7-1051 (N-benzyl-2-nitro-imidazoleacetamide). Intracytoplasmic lysis of parasites, early negatization of parasitemia and resolution of inflammatory lesions were observed in all treated animals. However, while the rates of parasitological cures reached 87.0% for the Peruvian strain it amounted to only 16.7% for the Colombian strain. A high degree of drug resistance was exhibited by the Colombian strain parasites recovered from mice submitted to prolonged treatment, which suggests that a drug selection of more resistant forms may have occurred.

Our data indicate that a drug susceptibility test for the *T. cruzi* isolated from patients with Chagas' disease could be a worthwhile procedure to be undertaken before a course of drug treatment is started in such patients.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S. G. — Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano (Contribuição do estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Pat. Trop.* 3: 65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. — Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Med. Bahia* 70: 32-42, 1970.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; CARVALHO, M. L. & GORINI, D. F. — Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica experimental pelo Bay 2502 (Resultados de tratamento a longo prazo). *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17: 380-389, 1975.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. & FIGUEIRA, R. M. — Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 19: 124-129, 1977.
- BRENER, Z. — Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. [Tese]. Belo Horizonte, 1961.
- BRENER, Z. — The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood stream of normal and immune mice. *An. Trop. Med. Parasitol.* 63: 215-220, 1969.
- FREDERICI, E. E.; ABELMAN, W. B. & NEVA, F. A. — Chronic and progressive myocarditis and myositis in C₃H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Amer. J. Trop. Med. & Hyg.* 13: 272-280, 1964.
- FERREIRA, H. O. — Tratamento da infecção chagásica com Ro 7-1051. *X Congresso da Soc. Brasil. Med. Trop.* (Curitiba, 1974), Programa e Sumário das Comunicações.
- LEVI, G. C.; AMATO NETO, V. & SANT'ANNA, J. F. de A. B. — Análise de manifestações colaterais devidas ao uso do medicamento Ro 7-1051, nitroimidazólico preconizado para tentativas de tratamento específico da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 17: 49-54, 1975.
- NUSSENZWEIG, V. & GOBLE, F. — Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma* (*Schyzotripanum*) *cruzi*. *Exp. Parasitol.* 18: 224-230, 1966.
- PIZZI, T. & PRAGER, R. — Inmunidad a la sobre infección induzida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulencia atenuada. *Bol. Inf. Parasit. Chilenas* 7: 20-21, 1952.
- RASSI, A. — Tentativas de tratamento etiológico da doença de Chagas com o composto Ro 7-1051 — resultados preliminares. *X Congresso da Soc. Brasil. Med. Trop.* (Curitiba, 1974), Programa e Sumário das Comunicações.
- ROCHE RESEARCH DEPARTMENT — Data sheet on Ro 7-1051, a new compound for oral treatment of Chagas' disease (original mimeografado — não publicado).

Recebido para publicação em 27/5/1976.