

ESTUDO EXPERIMENTAL SOBRE A RESISTÊNCIA DE UMA CEPA DO TRYPANOSOMA CRUZI AO BAY 2502

Sonia G. ANDRADE (1), Zilton A. ANDRADE (1) e Rozalia M. FIGUEIRA (2)

RESUMO

Isolando-se formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* (cepa Colombiana) de camundongos submetidos a tratamento prolongado pelo Bay 2502 e que não curaram, procurou-se investigar o grau de resistência desta cepa assim isolada, em comparação com a resistência inicial que a mesma apresentou. Para isto, estes tripomastigotas foram inoculados em camundongos, os quais foram submetidos a tratamento com o mesmo quimioterápico na primeira passagem e após 4 passagens sem nenhum tratamento. Os resultados demonstraram nítida acentuação da resistência da cepa Colombiana não só na primeira passagem como após 4 passagens em camundongos sem tratamento, o que foi demonstrado pelo estudo da resposta da parasitemia e pelo estudo histopatológico dos animais tratados. Como controles foram usados animais infectados com a mesma cepa, no mesmo número de passagens em camundongos, não submetidos a tratamento prévio. Sugere-se a possibilidade de que o tratamento inicial tenha destruído formas suscetíveis, conservando as formas resistentes que vieram a se multiplicar. Isto poderia levar ao desenvolvimento de cepas altamente resistentes, daí a necessidade de verificar a suscetibilidade de diferentes cepas aos quimioterápicos disponíveis.

INTRODUÇÃO

Estudando a diferença de suscetibilidade de diversas cepas do *Trypanosoma cruzi* aos quimioterápicos, tivemos a oportunidade de observar que a cepa Colombiana do *T. cruzi* apresenta acentuada resistência ao tratamento pelo Bay 2502³ diferindo nitidamente da resposta obtida com a cepa Peruana³ ao mesmo quimioterápico. O tratamento de animais infectados com esta última cepa pelo Bay 2502 determinou índice de 44% de cura parasitológica enquanto foi nula a porcentagem de cura nos animais infectados pela cepa Colombiana. Esta observação demonstra não somente a diferença de suscetibilidade de diferentes cepas a um mesmo quimioterápico, como sugere a possibilidade de que formas parasitárias existentes no hospedeiro vertebrado submetido a um tratamento prolongado, sejam

formas selecionadas, resistentes, que ao se reproduzirem venham a se constituir em uma cepa altamente resistente. A principal implicação desta hipótese, se confirmada, seria o risco de, em áreas endêmicas, serem transmitidas de pacientes tratados e não-curados, cepas altamente resistentes aos quimioterápicos disponíveis, através o ciclo natural: Homem — triatomíneo — homem.

A fim de testar esta hipótese, procurou-se verificar o grau de resistência da cepa Colombiana isolada de animais submetidos a tratamento prolongado pelo Bay 2502 e não-curados, em relação ao mesmo quimioterápico. Procurou-se além disto verificar se este grau de resistência se altera após passagens sucessivas no animal experimental, sem nenhum tratamento.

Trabalho realizado com Auxílio do Plano Integrado de Pesquisas em Doença de Chagas e Esquistossomose — Conselho Nacional de Pesquisas (9757/73 — TC 42/DC)

- (1) Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil
(2) Laboratório Central Gonçalves Moniz

MATERIAL E MÉTODOS

I) Isolamento de *T. cruzi* a partir de camundongos submetidos a tratamento prolongado.

1) Oito camundongos infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* e que haviam sido submetidos a tratamento pelo Bay 2502, durante 150 a 167 dias, conforme trabalho anterior³, permanecendo com parasitemias positivas, foram sacrificados e o sangue de cada animal inoculado individualmente em um grupo de animais recém-nascidos, em número de 5 a 6 camundongos para cada grupo. O isolamento das amostras foi feito individualmente, a partir de cada animal não curado, a fim de se testar a resistência de cada amostra isolada, frente ao mesmo medicamento. Em virtude disto os inóculos variaram entre 1.880 e 13.160 tripomastigotas em 0,2 ml de sangue citratado, de acordo com a parasitemia do doador.

2) Parte do sangue dos oito camundongos sacrificados, foi utilizada para, após mistura, servir de inóculo em um outro grupo de animais recém-nascidos, a partir do qual foram feitas 4 passagens sucessivas em camundongos sem nenhum tratamento. Os inóculos nas passagens sucessivas foram: 1.^a passagem: 22.560 tripomastigotas; 2.^a passagem: 181.420 tripomastigotas; 3.^a passagem: 184.580 tripomastigotas e 4.^a passagem: 150.400 tripomastigotas em 0,2 ml de sangue citratado.

II) Isolamento do *T. cruzi* a partir de grupos controles de infecção crônica.

Cinco camundongos controles do grupo tratado pelo Bay 2502, que sobreviveram até o final da experiência foram sacrificados e o sangue inoculado em camundongos recém-nascidos; o inóculo obtido foi de 11.280 tripomastigotas em 0,2 ml de sangue citratado. Este grupo se destina a comparar a resposta ao tratamento em relação aos grupos anteriores.

Grupos experimentais

Foram assim constituídos 3 grupos experimentais a saber:

Grupo I — Camundongos inoculados com a cepa Colombiana proveniente de animais

submetidos a tratamento prolongado;

Grupo II — Camundongos inoculados com a cepa Colombiana proveniente de animais submetidos a tratamento prolongado porém após 4 passagens em camundongos, sem nenhum tratamento;

Grupo III — Camundongos inoculados com a cepa Colombiana proveniente dos controles de infecção, não tratados previamente.

III) Estudo da resposta ao tratamento pelo Bay 2502

Grupo I — Os animais infectados com a cepa proveniente de grupo de tratamento prolongado pelo Bay 2502 foram submetidos a tratamento com a mesma droga, sendo subdivididos em tratados e controles de tratamento. O Bay 2502, derivado furfurilidênico, foi aplicado no seguinte esquema: 4 doses de 200 mg/k/dia em dias consecutivos seguidas de 5 doses semanais de 50 mg/k/dia. O tratamento foi iniciado no 17.^o dia de infecção. A duração do tratamento foi de 30 dias.

Grupo II — Os animais deste grupo foram submetidos ao mesmo esquema de tratamento, o qual foi iniciado no 20.^o dia da infecção e se prolongou durante 60 dias. O tratamento foi mais prolongado a fim de se poder testar a persistência da resistência adquirida, após passagens sucessivas sem tratamento.

Grupo III — Os animais infectados com tripanosomas provenientes de animais com infecção crônica, não previamente tratados, foram subdivididos em tratados e controles de tratamento. O esquema de tratamento foi o mesmo utilizado no Grupo I.

IV) Estudo histopatológico

Os animais tratados e não tratados dos Grupos I e III foram sacrificados no final do tratamento e os órgãos foram fixados em formol a 10%, incluídos em parafina e obtidas lâminas coradas em hematoxilina e eosina.

V) Avaliação dos resultados

Foi feita diariamente a avaliação da parasitemia através exame do sangue periférico em gota padronizada, obtida por secção da cauda e colhida com pipeta de hemoglobina, entre lâmina e lamínula 22 x 22; a contagem do número de tripomastigotas foi feita em 50 campos microscópicos 10 x 40. Esta avaliação foi feita nos animais tratados e nos não-tratados dos três grupos experimentais.

As lesões histopatológicas foram avaliadas, comparando-se os resultados do tratamento no Grupo I e no Grupo III.

RESULTADOS

I) **Níveis de parasitemia** — A comparação das curvas de parasitemia obtidas nos Grupos I e III (Figs. 1 e 2) mostra que há nítidas diferenças na resposta ao tratamento quando se consideram os animais infectados por cepa proveniente de animais submetidos a tratamento prolongado e os animais infectados com tripanosomas provenientes de animais não submetidos a tratamento previamente. No Grupo I as parasitemias sofreram moderado decréscimo a partir do 10.º dia de infecção porém as curvas conservaram a mesma configuração dos não tratados do mesmo grupo (Fig. 1). Os animais do Grupo III mostraram uma resposta rápida com decréscimo apreciável da parasitemia logo após o início do tratamento e negatização no 10.º dia, embora voltasse a positivar mais tarde (Fig. 2).

Considerando-se a resposta da parasitemia ao tratamento no Grupo II, em que foram feitas passagens sucessivas sem nenhum tratamento, observa-se resultado idêntico ao visto no Grupo I (Fig. 3).

II) **Lesões histopatológicas** — Os animais não submetidos a tratamento nos grupos I e III mostraram lesões teciduais predominantemente ao nível de músculo esquelético (Fig. 4) com miosite intensa e numerosas formas amastigotas no interior de fibras musculares, observando-se também miocardite de grau moderado. Os animais submetidos a tratamento no Grupo I, mostraram lesões menos intensas do que nos animais não-tratados do mesmo grupo, porém havia nítido processo de miosite intersticial (Fig. 6) e de miocardite crônica (Fig. 7) com raros parasitos no interior das fibras musculares. Nos animais do Grupo III submetidos a tratamento as lesões

teciduais eram muito discretas, praticamente ausentes em alguns animais, sendo vistos escassos parasitos nos tecidos (Fig. 5).

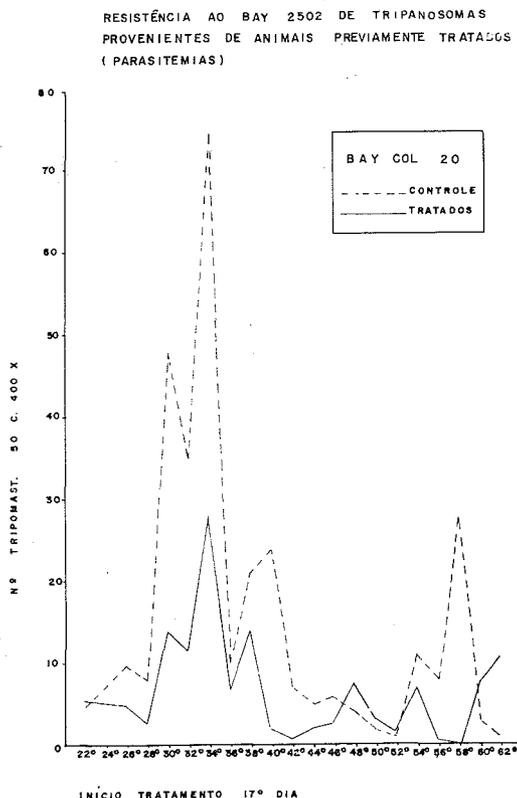


Fig. 1 — Parasitemia em animais do Grupo I: nítido decréscimo da parasitemia nos animais tratados porém não há negatização e a configuração das curvas é idêntica em ambos os grupos.

COMENTÁRIOS

Os resultados indicam que a resistência apresentada pela cepa Colombiana do *T. cruzi* ao tratamento pelo Bay 2502 (derivado furfurilidênico) foi nitidamente maior quando esta cepa foi isolada de animais tratados por período prolongado por esta droga. As passagens sucessivas em camundongos, sem nenhum tratamento não alteraram o grau de resistência que permaneceu mais elevado do que o observado com esta cepa quando proveniente de doador não previamente submetido ao uso da droga (Bay 2502). A maior resistência se traduziu não apenas pelo tipo de resposta da parasitemia como pela persistência de lesões teciduais, diferindo dos aspectos anteriormente descritos³ em animais submetidos

RESPOSTA AO TRAT. PELO BAY 2502 DE TRIPANOSOMAS
PROVENIENTES DE ANIMAIS NÃO TRATADOS (PARASITEMIA)

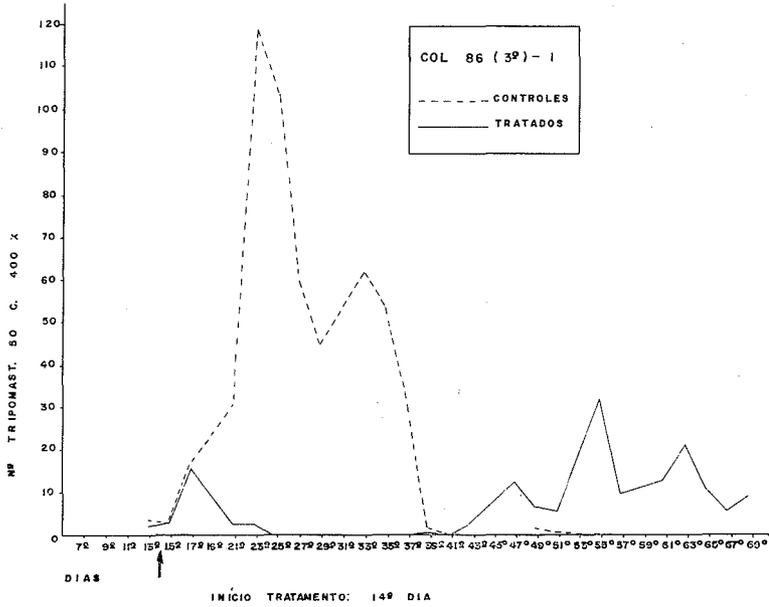


Fig. 2 — Parasitemia em animais do Grupo III: Há rápido decréscimo da parasitemia logo após o início do tratamento, com negativação.

RESPOSTA À TERAPEUTICA PELO BAY 2502 NA INFECÇÃO POR CEPA RESISTENTE
AO *T. CRUZI* APÓS PASSAGENS SUCESSIVAS SEM TRATAMENTO

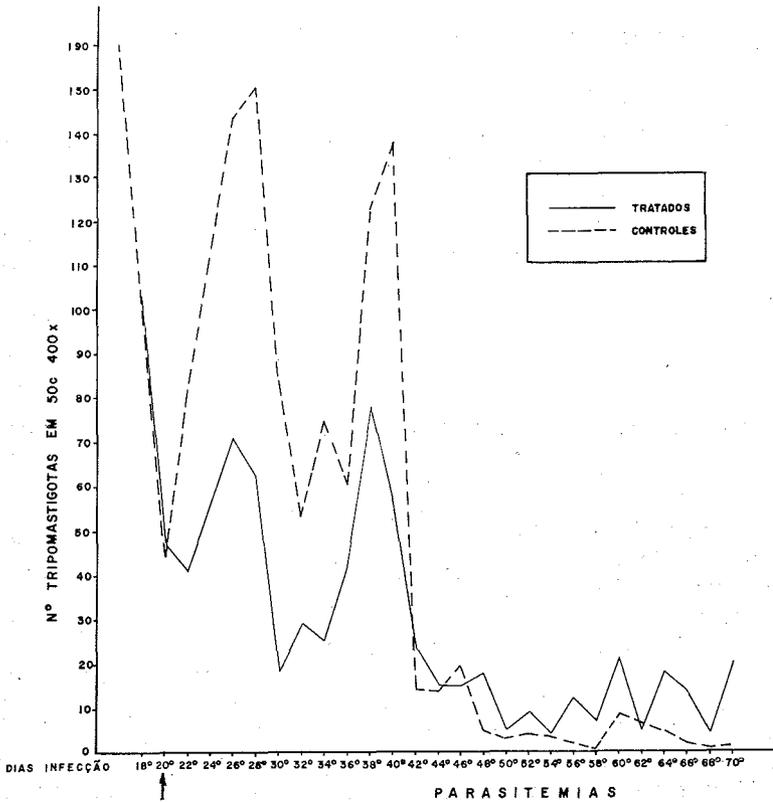


Fig. 3 — Parasitemia em animais do Grupo II: A resposta da parasitemia é idêntica à observada no Grupo I (Fig. 1).

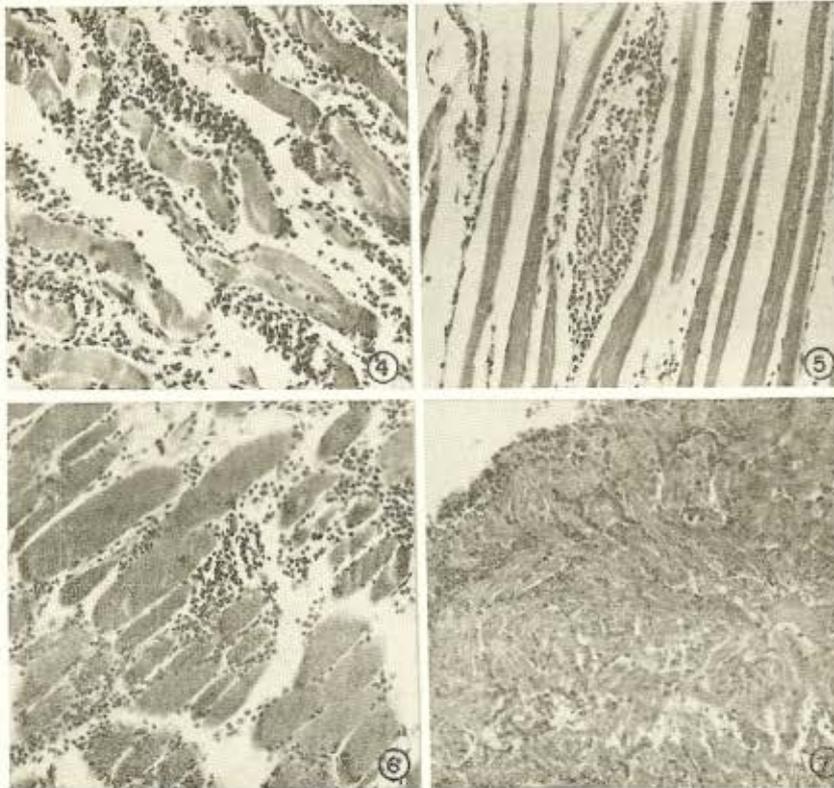


Fig. 4 — Miosite intensa em animal controle (Grupo III) não-tratado (infectado com a cepa proveniente de animais não-tratados) H.E., 120X.

Fig. 5 — Após tratamento os animais do Grupo controle (Grupo III) mostram nítido decréscimo do processo de miosite que fica limitado a pequenos focos peri-vasculares. H.E., 120X.

Fig. 6 — Miosite acentuada em animal infectado com tripomastigotas isoladas em animais previamente tratados (Grupo I) e que foram submetidos a tratamento com a mesma droga. H.E., 150X.

Fig. 7 — Miocardite difusa em animal submetido a tratamento do Grupo I. H.E., 120X.

a tratamento prolongado, em que as lesões teciduais eram ausentes ou muito discretas.

A observação do desenvolvimento de resistência aos nitrofurânicos foi referida por AMREIN¹, tratando culturas da cepa Tulauhen com doses gradualmente crescentes de Nitrofurazona. Observou este Autor que a resistência persistia mesmo após passagem em triatomíneos artificialmente alimentados com formas de cultura, ou após passagens em meios de cultura. No nosso estudo, as doses utilizadas para o tratamento foram muito elevadas e não houve, portanto, o desenvolvimento gradual de resistência. Além disto, a

cepa Colombiana se mostrou resistente desde o primeiro curso do tratamento. Trata-se portanto de uma resposta peculiar desta cepa, principalmente se levarmos em conta que o tratamento paralelo feito em animais infectados com a cepa Peruana que difere da Colombiana por vários dos seus caracteres² mostrou maior suscetibilidade da mesma.

Partindo da hipótese inicial deste trabalho, supôs-se que o tratamento destruiria as formas parasitárias suscetíveis, conservando entretanto as formas resistentes, que ao se multiplicarem poderiam mostrar maior grau de resistência ao quimioterápico. Parece-nos

que esta hipótese foi confirmada pelos achados do presente trabalho, em que se demonstrou maior resistência da cepa que fôra anteriormente submetida a tratamento.

Este fato sugere a necessidade de uma triagem de drogas a serem utilizadas na quimioterapia da doença de Chagas no sentido de verificar a suscetibilidade de diferentes cepas, principalmente se levarmos em conta observação feita anteriormente de que em uma mesma área geográfica pode predominar um mesmo tipo ou padrão de cepa¹. Evitar-se-ia desse modo o desenvolvimento de cepas altamente resistentes aos quimioterápicos disponíveis.

S U M M A R Y

Experimental studies on resistance to BAY 2502 presented by a strain of *T. cruzi*

The Colombian strain of *T. cruzi*, inoculated in mice, showed a definite drug resistance when the animals were treated with Bay 2502.

Surviving parasites isolated from mice submitted to prolonged treatment with the drug, reveal a marked drug resistance, greater than that observed during a first treatment.

This increased drug resistance was stable and could be demonstrated even when a new treatment was initiated after four passages in mice. These findings suggest that drug resistance in *T. cruzi* infection can be enhanced by a previous treatment with the drug.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, S. G. — Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Rev. Pat. Trop.* 3: 65-121, 1974.
2. ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L. & FIGUEIRA, R. M. — Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz. Med. Bahia* 70: 32-42, 1970.
3. 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.
4. AMREIN, Y. U. — Genetic transfer in trypanosomes. I — Syngamy in *Trypanosoma cruzi*. *Exptl. Parasitol.* 17: 261-263, 1965.

Recebido para publicação em 2/12/1975.