
USO DA ASSOCIAÇÃO DE BENZNIDAZOL E ESPIRONOLACTONA EM CAMUNDONGOS NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO PELO

Trypanosoma cruzi

Monique Castro da Silva Alves, Diana Rodrigues da Silva, Wanderson da Silva Batista e Gabriel Melo de Oliveira¹

RESUMO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, foi responsável por 4.916 óbitos no Brasil no ano de 2005, o que ressalta a importância de que se busquem novas formas de tratamento para esses pacientes. Estudos anteriores revelaram uma marcante lesão renal em camundongos infectados pelo *T. cruzi* nos estágios iniciais da infecção. Além disso, foi constatado que o bloqueio das vias cardiovascular e renal (como o sistema renina angiotensina-aldosterona) diminuiu a mortalidade dos animais em 40%. Recentemente foi observado que o bloqueio de aldosterona minimiza a perda de potássio e os efeitos cardiovasculares da infecção pelo *T. cruzi*. O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência da associação entre o benznidazol (Bz) e a espironolactona (Sp) na condição física dos camundongos infectados. Comparando os camundongos infectados e os tratados com Bz/Sp, observamos que a associação promove uma sobrevivência de 100%, com ganho de peso, manutenção do consumo de alimentos e da atividade física dos animais. Em comparação com o tratamento somente com Bz, a combinação mantém níveis superiores das atividades motora e exploratória, principalmente no 15º dia pós-infecção. Os dados sugerem, portanto, que a associação entre Bz e Sp apresenta uma benéfica influência na condição física dos camundongos durante a fase aguda experimental.

DESCRITORES: *Trypanosoma cruzi*. Fase aguda. Associação de benznidazol e espironolactona. Sistema renina angiotensina aldosterona. Camundongos.

ABSTRACT

The impact of the benznidazole and spironolactone combination in the evolution of the acute phase of *Trypanosoma cruzi*-infected mice

Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, was the cause of 4,916 deaths in 2005 in Brazil, underscoring the importance of searching for new forms of treatment for these patients. Previous

1 Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brasil.

Correspondência para: Gabriel Melo de Oliveira, Lab. Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil 4365, Manguinhos, CEP: 21045-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. E-mail: gmoliveira@ioc.fiocruz.br

Recebido para publicação em: 22/7/2011. Revisto em: 11/1/2012. Aceito em: 17/4/2012.

studies have shown that mice infected with *T. cruzi* present marked renal injury in the early stages of infection. Furthermore, the blockade of the cardiovascular and renal pathways (such as RAAS) reduced the mortality of the animals by 40%. Recently, it was observed that blocking aldosterone minimizes the loss of potassium and the cardiovascular effects of the infection with *T. cruzi*. The objective of this study was to evaluate the efficiency of the association between Bz and Sp on the physical condition of the infected mice. Comparing mice infected and treated with Bz / Sp, we observed that the association promoted a 100% survival, weight gain, maintenance of food intake and physical activity of animals. Furthermore, the treatment corresponding to Bz only kept high levels of motor and exploratory activity, especially in the 15th dpi. Thus, we concluded that the association between Bz and Sp has a beneficial influence on the physical condition of mice during the acute phase trial.

KEY WORDS: *Trypanosoma cruzi*. Acute phase. Association of benznidazole and spironolactone. Renin angiotensin aldosteron system. Mice.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* ocorre de forma endêmica em, aproximadamente, 18 países da América Latina. Estima-se que haja 17 milhões de pacientes e que 100 milhões de pessoas (25% da população do continente latino-americano) estejam sob risco de contrair a infecção (22). Segundo a base de dados do Ministério da Saúde, as doenças relacionadas à pobreza são responsáveis por 82,5 mil mortes a cada ano. No ano de 2005, a doença de Chagas foi a causa de óbito de 4.916 pessoas, sendo considerada a mais grave doença crônica transmissível no Brasil (10). A partir de um multiprograma coordenado por vários países do Cone Sul, o Brasil recebeu a certificação da eliminação do *Triatoma infestans*, espécie totalmente domiciliada, porém a transmissão vetorial continuou a ser feita por outras espécies. Paralelamente, a transmissão sanguínea também foi interrompida (5, 13, 27). A transmissão do *T. cruzi* pela via oral tem apresentado grande importância. Segundo Coura (2006), mais de 50% de casos agudos da doença de Chagas registrados na Amazônia brasileira entre 1968 e 2000 foram atribuídos a microepidemias de infecção transmitida pela via oral (6). Este tipo de infecção está associado a uma elevada taxa de mortalidade, geralmente nas primeiras duas semanas após o evento (13, 26).

Em relação ao modelo experimental (camundongo e parasito), apesar de alguns autores descreverem uma forma disseminada da infecção pelo *T. cruzi* durante a fase aguda experimental, a presença do parasito nos tecidos é predominantemente associada às musculaturas cardíaca e esquelética e também ao sistema nervoso em razão do tropismo da cepa de *T. cruzi* envolvida (12). O acometimento renal é pouco abordado pela literatura, não havendo sequer uma detalhada abordagem sobre a presença do parasito no tecido renal. Lenzi et al. (1996) relataram que, no modelo murino, o parasito pode ser encontrado em diversos órgãos, inclusive no rim. Estes autores observaram também que a lesão tecidual está associada à presença e à multiplicação parasitária (19). Outros autores, utilizando cepas diferentes do *T. cruzi*, observaram reduzido parasitismo tecidual no rim durante a fase aguda (20).

A insuficiência cardíaca ocorre, portanto, por uma reação em cadeia que envolve os sistemas cardiovascular e renal e alterações hematológicas dos camundongos (23). Resultados recentes demonstram que camundongos infectados apresentam lesão renal aguda nos estágios iniciais da infecção (não relacionada à presença ou à multiplicação parasitária) decorrente da intensa modulação inflamatória local em resposta ao parasito (11, 24). No eixo cardiorrenal, há alterações eletrocardiográficas e cardiovasculares, acometimento inflamatório cardíaco, insuficiência cardíaca e 80% de mortalidade (23). Além disso, também observamos marcantes alterações na condição física dos animais (8).

Ficou, assim, evidenciado um acometimento sistêmico do camundongo pelo *T. cruzi*. Especificamente no estudo do eixo cardiorrenal, nossos resultados preliminares, no que se refere ao sistema renina angiotensina-aldosterona (SRAA), demonstram que camundongos que tiveram bloqueada a ação da enzima conversora de angiotensinogênio (ECA) e de aldosterona minimizaram a perda de potássio e apresentaram queda de 30% a 40%, respectivamente, na mortalidade durante o curso agudo da infecção experimental (25). Por outro lado, quando bloqueamos os receptores AT1, observamos um aumento de 10% a 20% da mortalidade dos animais (25). Estes resultados demonstram que não somente o coração está afetado, há também uma importante interconexão entre a lesão renal e a insuficiência cardíaca e que, possivelmente, a condição física e a mortalidade dos animais estão relacionadas às alterações em diversos sistemas.

Atualmente existe apenas uma droga disponível para o tratamento desta doença, o benznidazol, apesar de suas limitações como os diversos efeitos colaterais (1, 21). Este medicamento foi introduzido na clínica como potente tripanocida nas décadas de 1960 e 1970, mas, de um lado, há divergências quanto aos percentuais de cura e, de outro, há consenso sobre a sua utilidade, a depender de circunstâncias como: transmissão congênita, fase da doença, idade do paciente e condições associadas (7, 14). Portanto, é necessário que se busquem novos medicamentos tripanocidas com menor toxicidade. Deve-se também ressaltar que a produção deste medicamento não está sendo suficiente para atender às necessidades primárias do tratameto. Outra necessidade é a busca por protocolos terapêuticos associados ao benznidazol que sejam capazes (com a mesma eficácia tripanocida) de melhorar a condição clínica dos pacientes (18, 30).

Considerando que o uso de espironolactona promoveu uma significativa redução da mortalidade de camundongos durante a fase aguda (25), nossa hipótese principal baseia-se na avaliação da importância do eixo cardiorrenal na morbimortalidade durante a infecção experimental. Neste trabalho, objetivamos avaliar com base em parâmetros não invasivos (peso corporal, consumo de água e ração, atividade motora, exploratória e temperatura corporal), especificamente, a influência do tratamento com a associação de benznidazol e espironolactona na condição física dos camundongos infectados pelo *T. cruzi*, uma vez que a espironolactona bloqueia os efeitos negativos da aldosterona (desequilíbrio eletrolítico, por exemplo) nos animais durante a fase aguda experimental.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Camundongos BALB/c, machos, adultos, livres de patógenos específicos (*s.p.f.*) e não isogênicos foram obtidos do Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL/FIOCRUZ). Os animais foram alojados durante uma semana antes da infecção na Setor de Experimentação Animal (Laboratório de Biologia Celular/Laboratório de Inovações em Terapias, Biofilmes e Ensino, IOC) e mantidos em condições estáveis de temperatura e com ciclos de 12 horas de claro e escuro. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes estabelecidas pelo Comitê Ético para o Uso de Animais da Fiocruz (Licença nº 020/08). O número de animais utilizados em cada conjunto experimental foi de n=10 por grupo em ensaios em triplicata.

Parasitos e infecção: A cepa Y de *T. cruzi* foi mantida por passagem em camundongos Swiss Webster não isogênicos e as formas de tripomastigotas sanguíneas foram isoladas como descrito anteriormente (1). Os parasitos foram ressuspensos em tampão fosfato (PBS) e contados em um hemocítômetro para ajustar o inóculo na concentração de 5×10^3 parasitos/mL. A infecção foi realizada com 200 µl da suspensão (1×10^3 parasitos) por via intraperitoneal (ip) nos grupos infectados tratados e não tratados.

Protocolos terapêuticos: O tratamento foi realizado a partir do 5º dia pós-infecção (dpi) (momento do surgimento de parasitos na corrente sanguínea) com Benznidazol (Bz) (Lafepe Benznidazol 100mg – Brasil) e Espironolactona (Sp) (Eurofarma Espironolactona 25mg – Brasil) por vinte dias consecutivos por via oral (gavagem e *ad libitum*, respectivamente) (2, 31). Conforme descrito na literatura, utilizamos as dosagens em camundongos de 100mg/Kg para Bz e 20mg/Kg para Sp (2, 31). Os grupos experimentais foram divididos em: G1) não infectado e não tratado (N); G2) infectado e não tratado (Inf); G3) infectado e tratado com Bz (Inf/Bz); G4) infectado e tratado com Sp (Inf/Sp) e G5) infectado e tratado como Bz e Sp (Inf/Bz/Sp).

Parâmetros parasitológicos e pesagem corporal: A parasitemia foi determinada diariamente entre o 5º e 12º dias pós-infecção (dpi) para que púdessemos observar a elevação e a queda do número de parasitos no respectivo modelo experimental (BALB/c & cepa Y) e quantificá-los pelo método Pizzi-Brener (3). O peso corporal de todos os camundongos foi avaliado diariamente de 0 a 30 dpi. A mortalidade foi anotada diariamente e os índices percentuais da mortalidade cumulativa (%MC) foram calculados no 40º dpi.

Parâmetros não invasivos: Consumo de alimentos: Iniciamos uma semana antes da infecção a estimativa do consumo diário de ração e água. Este valor

foi obtido calculando-se a diferença entre o peso/volume ofertado (250g/250ml) e o retirado após 24 horas em cada gaiola. O consumo individual foi calculado seguindo-se as fórmulas: $Cons_{total} = \text{peso ou volume adicionado} - \text{peso ou volume, após 24 h}$. Então o consumo individual considerado foi: $Cons_{ind} = Cons_{total} / \text{número de animais por gaiola}$.

Atividades motoras e exploratórias: Para melhor caracterizar a atividade espontânea de camundongos, foi utilizado o sistema Noldus EthoVision XT6 (Noldus Tecnologia da Informação, Leesburg, Holanda). A arena foi definida com 12 retângulos, divididos em áreas laterais e centrais. Na arena total, os retângulos foram calibrados com as dimensões iguais para garantir a consistência dos parâmetros em que o aparelho Noldus EthoVision XT6 detectou a transição dos movimentos do camundongo (15, 16).

Esta análise foi utilizada para medir: a) a atividade motora, ou seja, a distância percorrida na arena (cm) e a velocidade média (cm/s); b) a atividade exploratória, a frequência (número de eventos) e o tempo de permanência (segundos) no quadrante central em cinco minutos, semanalmente entre os dias 0 e 30 pós-infecção. Para isso, foi gravado um vídeo por meio de uma câmera colocada a 1,0m de distância da arena de observação.

Temperatura auricular: Durante o curso da infecção, a temperatura corporal de cada camundongo foi avaliada semanalmente por meio da contenção física e da avaliação da temperatura auricular, utilizando-se um termômetro pediátrico digital, Braun ThermoScan (Braun Ind., São Paulo, Brasil), também entre os dias 0 e 30 pós-infecção.

Análises estatísticas: O teste de MannWhitney (não paramétrico) foi utilizado para comparar todos os grupos de dados (*software* SPSS versão 8.0); os valores de significância ($P \leq 0,05$) foram expressos em relação a: a) diferença estatística observada entre o grupo *Inf/Bz/Sp* e *Inf*, indicada por asterisco nas figuras e legendas; b) diferença estatística observada entre os grupos *Inf/Bz/Sp* e *Inf/Bz* e indicada por asterisco; c) diferença estatística calculada entre os grupos *Inf* e *Inf/Sp* e indicada por &. O desvio padrão é indicado por $\pm SD$.

RESULTADOS

Os resultados demonstram que, em relação aos parâmetros parasitológicos (Figura 1), diferentes aspectos podem ser observados. Na contagem de parasitos (Figura 1A), os grupos *Inf e Inf/Sp* apresentaram valores semelhantes, principalmente no 8º dpi (348.4 ± 64 e 300.0 ± 44 parasitos $\times 10^4$ parasitos/ml, respectivamente) que foi o pico de parasitemia. Durante o tratamento com Bz nos grupos *Inf/Bz* e *Inf/Bz/SP*, ainda foi possível observar raros parasitos até o 7º dpi (1.4 ± 0.5 e $4.1 \pm 0.2 \times 10^4$ par/ml), que estavam completamente zerados, em ambos os grupos, a partir

do 3º dia de tratamento (8º dpi). Em relação à mortalidade cumulativa (Figura 1B), observamos que os camudongos infectados sem tratamento (*Inf*) apresentaram 80% de mortalidade, ao passo que os animais infectados que receberam o tratamento com Sp (*Sp*) tiveram sua mortalidade reduzida para 40% até o 40º dpi. Nos grupos tratados (*Inf/Bz* e *Inf/Bz/Sp*), foi de 100% a sobrevida durante toda a fase aguda experimental.

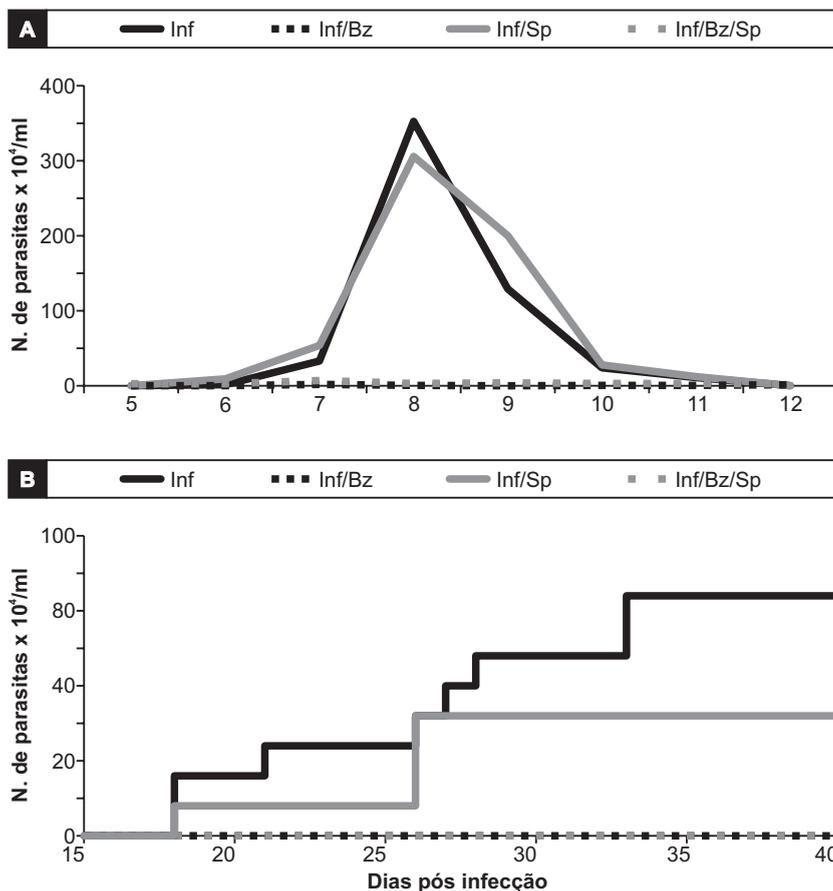


Figura 1. Parâmetros biológicos. Curva de parasitemia (A) e mortalidade cumulativa (B). Realizamos a quantificação (número de parasitos x 10⁴/ml) e a comparação entre os grupos: camudongos infectados sem tratamento (*Inf*), infectados tratados com Bz (*Inf/Bz*), infectados e tratados com Sp (*Inf/Bz/Sp*) e infectados e tratados com a associação de Bz e Sp (*Inf/Bz/Sp*) até o 12º dpi. Observamos a mortalidade cumulativa e descrevemos em percentual (%) a contagem de óbitos até o 40º dpi.

A pesagem corporal dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* (Figura 2) foi realizada diariamente em todos os grupos. O grupo *N* apresentou um ganho de peso de $3,4 \pm 0,5$ g entre os dias 0 e 30 pós-infecção. Inversamente, os camundongos do grupo *Inf* neste mesmo período demonstraram uma queda média no peso corporal de $2,8 \pm 0,9$ g. Observamos que, no tratamento com SP, ocorreu perda de peso com valor médio de $1,6 \pm 0,2$ g, significativamente menor que o grupo *Inf*. No grupo tratado com Bz, ocorreu um ganho de peso similar ou acima dos valores normais. O grupo *Inf/Bz* apresentou um ganho de $3,7 \pm 0,9$ g, ao passo que na associação de Bz e Sp foi observado um ganho de peso superior, com valores médios de $4,7 \pm 1,0$ g, em relação aos animais tratados com Bz entre os dias 0 e 30 pós-infecção.

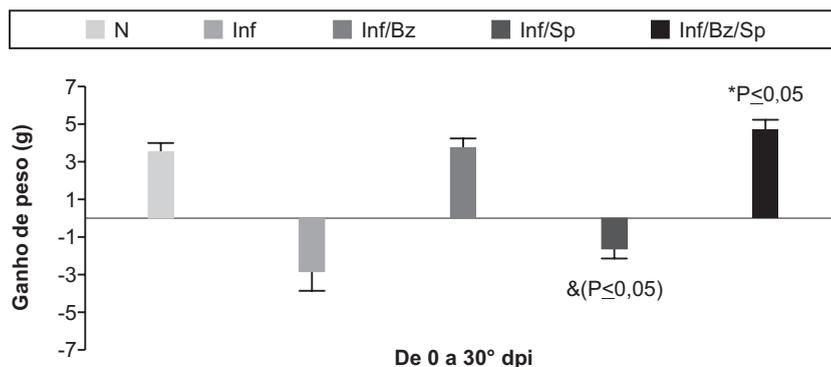


Figura 2. Cálculo do ganho de peso. O ganho de peso (eixo Y com números positivos) ou a perda de peso (eixo Y com números negativos) foram expressos em gramas para os grupos: camundongos sem infecção (*N*), infectados sem tratamento (*Inf*), infectados tratados com Bz (*Inf/Bz*), infectados e tratados com Sp (*Inf/Sp*) e infectados e tratados com a associação de Bz e Sp (*Inf/Bz/Sp*). (*) indica que houve uma significância estatística ($P \leq 0,05$) para o ganho de peso do grupo *Inf/Bz/Sp* em relação ao *Inf/Bz*. (&) indica a diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos *Inf* e *Inf/Sp* entre os dias 0 e 30 pós-infecção.

A Figura 3 demonstra os resultados da pesagem corporal. O menor consumo de ração e água (Figura 3A e B) foi observado nos animais do grupo *Inf* com uma queda média de $2,8 \pm 0,08$ g e $3,0 \pm 0,07$ ml. Cada camundongo consumia aproximadamente 5,0g de ração e 5,2ml de água por dia antes da infecção. Após 30 dias de infecção, o consumo individual médio desses animais caiu para 2,2g de ração e 2,2ml de água. O tratamento com Bz gerou uma queda no consumo para $2,1 \pm 0,09$ g de ração e $1,7 \pm 0,08$ ml de água. Já o tratamento com Bz e Sp manteve o consumo de alimento praticamente semelhante entre os dias 0 e 30 pós-infecção. Foi possível observar uma leve queda no consumo de ração ($0,2 \pm 0,001$ e $0,1 \pm$

0,001 g) e de água ($0,4 \pm 0,002$ e $0,7 \pm 0,001$ ml). Além disso, o grupo *Sp* apresentou uma queda significativamente menor do consumo tanto de água quanto de ração em relação aos animais *Inf*. Os animais sem infecção aumentaram seu consumo de ração e água em $1,0 \pm 0,08g$ e $1,0 \pm 0,07ml$, respectivamente.

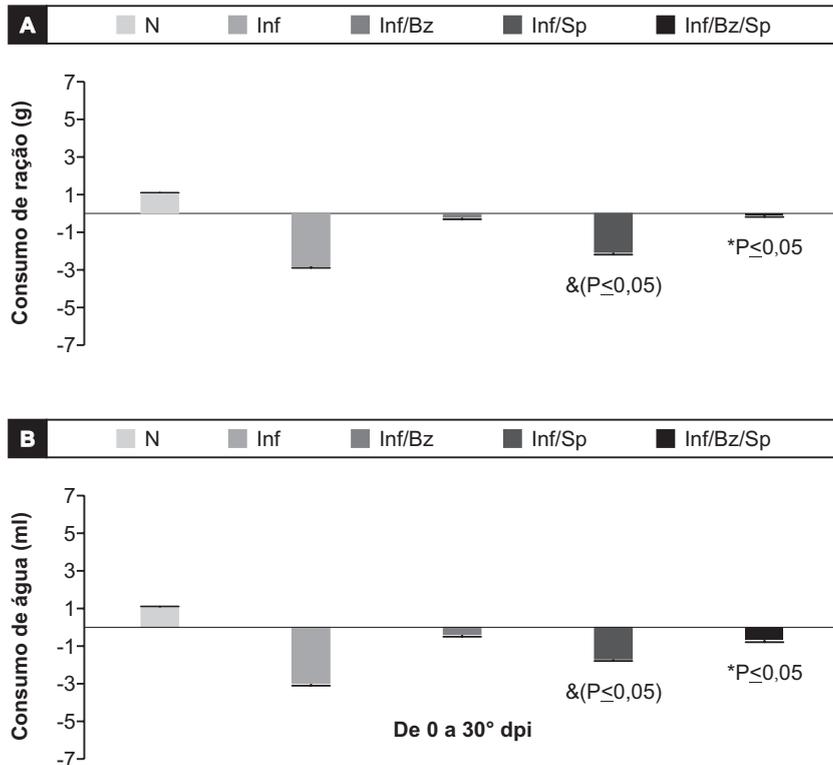


Figura 3. Cálculo do consumo de alimentos: A diferença entre a pesagem/volume de ração (A) e água (B) disponibilizada e a retirada após 24 horas fundamentou o consumo individual de alimentos. O aumento (eixo Y com números positivos) de consumo (em gramas ou mililitros) ou diminuição (eixo Y com números negativos) foi expresso para os grupos: camundongos sem infecção (*N*), infectados sem tratamento (*Inf*), infectados tratados com Bz (*Inf/Bz*), infectados e tratados com Sp (*Inf/Bz*) e infectados e tratados com a associação de Bz e Sp (*Inf/Bz/Sp*). (*) indica que houve uma significância estatística ($P \leq 0,05$) para o consumo de ração ou água do grupo *Inf/Bz/Sp* em relação ao *Inf/Bz*. (&) indica a diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos *Inf* e *Inf/Sp* entre os dias 0 e 30 pós-infecção.

Um importante fator de avaliação da condição de saúde dos animais foi a mensuração das atividades motoras e exploratórias (Figuras 4 e 5). Em relação à atividade motora, primeiramente foi avaliada a distância total percorrida na arena (cm) (Figura 4A). Antes da infecção, todos os grupos percorreram distâncias semelhantes. Durante todo o curso da infecção, o grupo *Inf/Bz/Sp* apresentou valores superiores ao animal infectado sem tratamento (8° dpi: $2,287 \pm 48$ vs $1,971 \pm 123$; 15° dpi: $2,470 \pm 98$ vs $1,223 \pm 84$; 22° dpi: $2,415 \pm 56$ vs 282 ± 23 e 30° dpi: $2,834 \pm 101$ vs 896 ± 59 cm). No 15° dpi, os animais infectados que foram tratados com a associação de Bz e Sp também demonstraram melhor atividade física quando comparados com os animais que receberam somente o tratamento com Bz ($2,470 \pm 98$ vs $1,841 \pm 41$ cm), uma vez que percorreram maior distância. Ressaltamos que no 22° e no 30° dpi ocorreu uma diferença significativa entre os grupos *Inf* e *Inf/Sp* (22° dpi: $0,25 \pm 0,001$ vs $0,6 \pm 0,001$; 30° dpi: $0,6 \pm 0,01$ vs $1,4 \pm 0,5$ cm). Outro parâmetro da atividade motora avaliado foi a velocidade média de deslocamento (cm/s) (Figura 4B). Antes da infecção, todos os animais de todos os grupos apresentaram valores semelhantes. Porém, a partir do 8° dpi, os animais do grupo *Inf/Bz/Sp* mantiveram sua velocidade com valores superiores ao grupo *Inf* (8° dpi: $7,4 \pm 0,8$ vs $4,9 \pm 0,4$; 15° dpi: $7,8 \pm 0,6$ vs $4,3 \pm 0,3$; 22° dpi: $8,1 \pm 0,9$ vs $0,9 \pm 0,01$ e no 30° dpi: $9,5 \pm 1,0$ vs $3,9 \pm 0,2$ cm/s). Comparando a atividade motora do grupo *Inf/Bz/Sp* com a do grupo *Inf/Bz*, no 15° dpi os valores do primeiro grupo também foram superiores: $7,8 \pm 0,6$ vs $6,2 \pm 0,8$ cm/s.

A atividade exploratória (Figura 5), avaliada pelo número de presenças (frequência) do animal (n° de eventos) no quadrante central (Qc) da arena, encontra-se demonstrada na Figura 5A e o tempo de permanência do animal neste quadrante encontra-se na Figura 5B. Os animais tratados com a associação de Bz e Sp apresentaram maior interesse exploratório que os animais infectados que não receberam tratamento e, no 15° dpi, foi superior também aos camundongos infectados e tratados somente com Bz. A comparação *Inf* vs *Inf/Bz/Sp*, no parâmetro frequência no Qc, demonstrou os seguintes resultados: 8° dpi: $4,5 \pm 0,5$ vs $6,0 \pm 0,5$; 15° dpi: $2,9 \pm 1,0$ vs $7,0 \pm 0,8$; 22° dpi: $0,8 \pm 0,1$ vs $5,9 \pm 0,5$ e no 30° dpi: $3,1 \pm 0,2$ vs $6,0 \pm 0,6$ eventos. A comparação *Inf/Bz/Sp* vs *Inf/Bz* apresentou os seguintes resultados: no 15° dpi: $7,0 \pm 0,5$ vs $3,0 \pm 0,1$ eventos.

Em relação ao tempo de permanência, a comparação *Inf* vs *Inf/Bz/Sp* demonstrou os seguintes resultados: 15° dpi: $2,6 \pm 1,0$ vs $6,0 \pm 0,8$; 22° dpi: $0,3 \pm 0,01$ vs $5,9 \pm 0,5$ e no 30° dpi: $2,5 \pm 0,2$ vs $7,5 \pm 0,6$ eventos. A comparação *Inf/Bz/Sp* vs *Inf/Bz* apresentou os seguintes resultados no 15° dpi: $6,0 \pm 0,5$ vs $3,0 \pm 0,1$ eventos.

Os animais não infectados e não tratados (*N*) não demonstraram alteração em seus níveis de atividade motora e exploratória. Além disso, a temperatura corporal não demonstrou alterações significativas durante o curso da infecção (dados não mostrados).

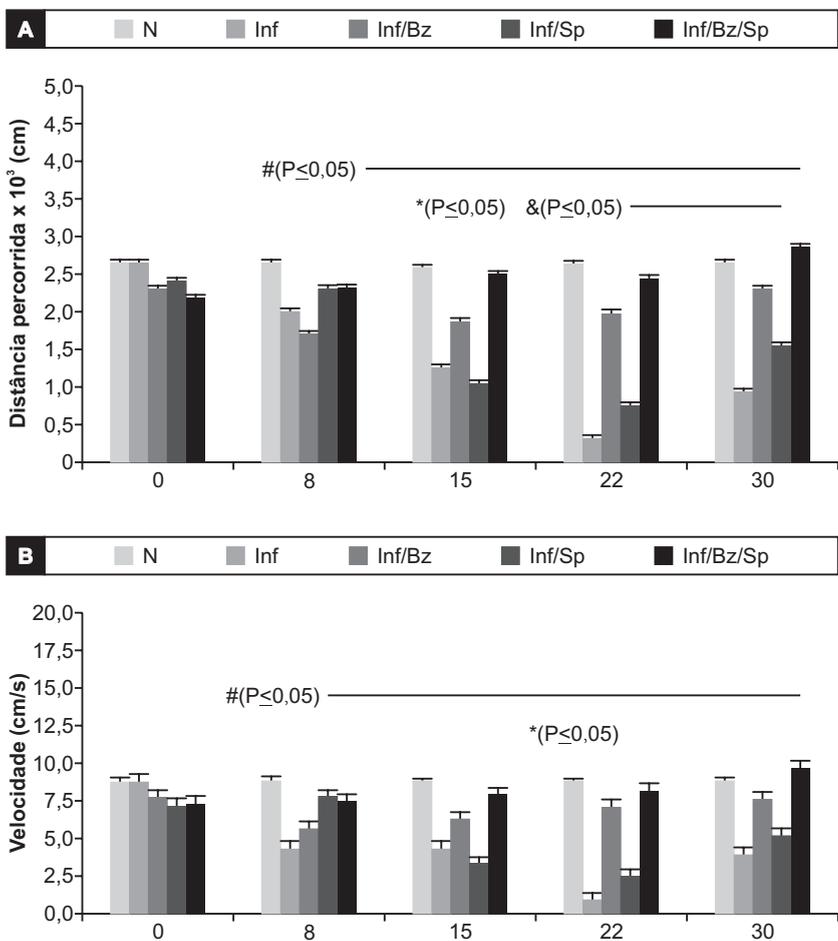


Figura 4. Atividade motora. A atividade motora foi medida pela distância total percorrida (A) em centímetros (cm) e a velocidade média (centímetros/segundo) (B) dos respectivos grupos: camundongos sem infecção e sem tratamento (*N*), camundongos infectados sem tratamento (*Inf*), infectados tratados com Bz (*Inf/Bz*) e infectados e tratados com Sp (*Inf/Sp*) e infectados e tratados com a associação de Bz e Sp (*Inf/Bz/Sp*). (#) indica a diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos *Inf/Bz/Sp* e *Inf* entre o 8º e o 30º dpi. (*) indica a diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos *Inf/Bz/Sp* e *Inf/Bz* no 15º dpi. (&) indica a diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos *Inf* e *Inf/Sp* nos dias 22 e 30 pós-infecção.

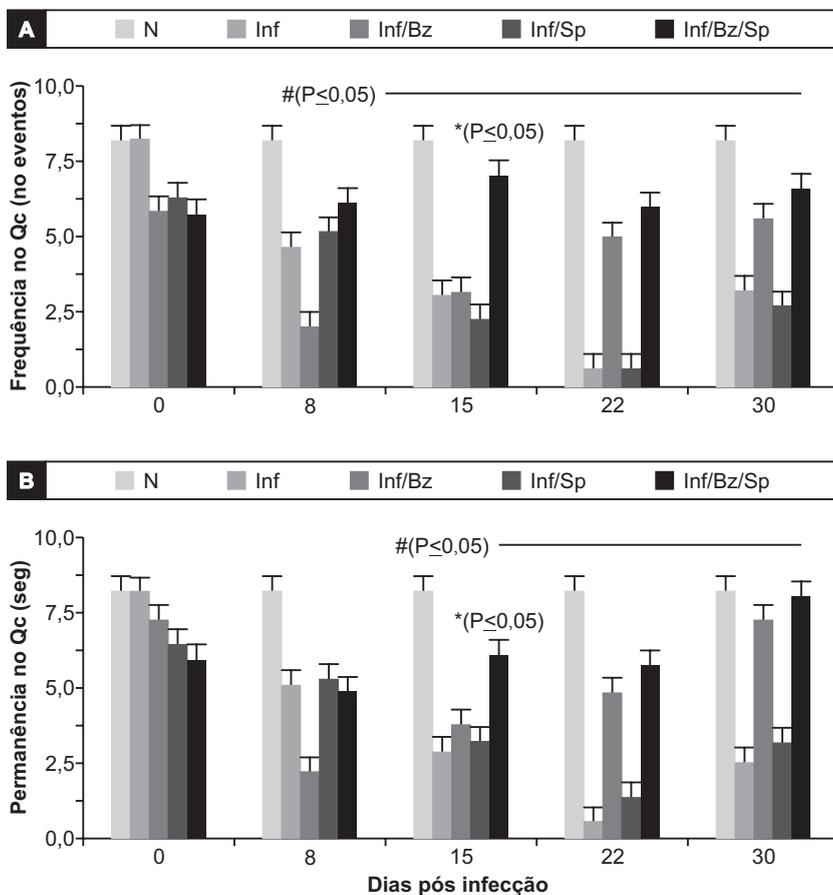


Figura 5. *Atividade exploratória.* Foi mensurado o interesse exploratório pela frequência do animal no quadrante central (Qc), descrita em número de eventos (A), e o tempo de permanência dos indivíduos neste quadrante em segundos (B). Foram comparados os seguintes grupos: camundongos sem infecção e sem tratamento (*N*), camundongos infectados sem tratamento (*Inf*), infectados tratados com Bz (*Inf/Bz*), infectados e tratados com Sp (*Inf/Sp*) e infectados e tratados com a associação de Bz e Sp (*Inf/Bz/Sp*). (#) indica a diferença estatística ($P \leq 0,05$) entre os grupos *Inf/Bz/Sp* e *Inf* entre o 8º (ou 15) e o 30º dpi. (*) indica a diferença estatística ($p \leq 0,05$) entre os grupos *Inf/Bz/Sp* e *Inf/Bz* no 15º dpi.

DISCUSSÃO

A importância do eixo cardiorrenal é pouco explorada na literatura que trata da infecção pelo *T. cruzi*. Porém, acerca do uso de bloqueadores do SRAA na infecção experimental pelo parasito existem interessantes abordagens. Leon et al. (2003) demonstraram que a utilização de captopril (inibidor da ECA), dependendo da dose, reduziu significativamente o processo de necrose e fibrose em camundongos infectados e, contrariamente, o aumento da invasão parasitária nos cardiomiócitos que expressam receptores para bradicinina do tipo 2 (B2R) (17, 29). Além disso, os tecidos altamente vascularizados, como parênquima renal e pulmões, abundantes na expressão de ECA (9), apresentam reduzida invasão celular pelo *T. cruzi* (19). Em relação ao bloqueio da aldosterona, o uso de espironolactona atenuou a remodelação do miocárdio durante a fase crônica sintomática, diminuindo a gravidade da miocardiopatia chagásica dilatada pela redução da infiltração inflamatória neste tecido (28). Além disso, em pacientes com miocardiopatia chagásica crônica, a otimização do tratamento com enalapril e espironolactona e a adição subsequente de carvedilol foram seguros e benéficos na função cardíaca e na condição clínica dos doentes (4).

Em relação à infecção experimental, com o uso de captopril em uma linhagem susceptível de camundongos (BALB/c) infectados com a cepa Y de *T. cruzi* foi observado que os animais apresentaram valores semelhantes de parasitemia, porém menor mortalidade em relação ao seu controle infectado e não tratado (23). O bloqueio da aldosterona e dos receptores para angiotensina do tipo 1 (AT1R), pelo uso de espironolactona e losartana (Lo), respectivamente, apresentou resultados contrários entre si (25). O uso de Sp diminuiu a mortalidade em 40%, ao passo que o uso de Lo aumentou a mortalidade em 20% (25).

Apesar de todos os esforços que resultaram na interrupção da transmissão vetorial do parasito no Brasil, ainda há um grande número de pacientes infectados e outro relevante número de pessoas sob risco de infecção que irão desenvolver a doença e os sintomas na fase aguda (7). Somente o Bz está disponível para o tratamento dos pacientes chagásicos no Brasil. Este composto possui eficiência discutível na fase crônica e marcantes efeitos colaterais durante o seu tratamento, principalmente em idosos (27). Assim, torna-se necessária a busca de protocolos terapêuticos que substituam ou se associem com o Bz para minimizar a gravidade da doença e aumentar a qualidade de vida dos pacientes infectados (18).

Neste trabalho, nosso objetivo foi avaliar a eficiência da associação entre Bz e Sp na melhora da condição física de camundongos infectados pelo *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção. Os parâmetros parasitológicos demonstram que a associação com Sp não compromete a atividade tripanocida do Bz. Os valores de parasitemia e mortalidade cumulativa foram semelhantes. A condição física do nosso modelo experimental foi observada com base em parâmetros não invasivos como pesagem corporal, consumo de alimentos e atividades motoras e exploratórias (8).

Nossos resultados demonstram que, em relação aos animais infectados (sem tratamento), a associação de Bz e Sp promoveu uma melhora da condição física dos animais, representada por ganho de peso, maior atividade física e maior interesse exploratório em todos os dias pós-infecção. Quando comparamos os camundongos infectados que receberam somente o tratamento com Bz com os que receberam a associação de Bz e Sp, observamos que, durante todo o curso da infecção, esta associação demonstrou valores similares para o consumo de alimento, tendência ao ganho de peso e aumento da atividade física. Outrossim, no 15º dpi, tanto a atividade motora quanto o interesse exploratório foram significativamente maiores nos camundongos que receberam o tratamento associado em relação aos que foram tratados somente com Bz.

Estes resultados podem servir de subsídios para futuros ensaios que avaliem a importância do eixo cardiorrenal na gênese da miocardiopatia dilatada, o mecanismo de ação do SRRA no agravamento da infecção experimental e, principalmente, o papel da aldosterona. Além disso, devem ser estudados tratamentos associados ao Bz que mantenham a eficácia tripanocida, minimizem a toxicidade e melhorem a condição física de animais infectados.

CONCLUSÕES

O uso de Bz reduziu drasticamente a mortalidade do modelo susceptível (BALB/c & cepa Y), porém não corrigiu outras alterações sistêmicas promovidas pela cepa Y durante a infecção experimental aguda em camundongos BALB/c. Nossos resultados sugerem que a aldosterona possui uma importante influência na morbimortalidade dos animais. Além disso, o uso associado de benznidazol e espirolactona promove significativa melhora na condição física dos camundongos infectados pelo *T. cruzi* durante a fase aguda, considerando-se principalmente o ganho de peso corporal, a elevação da atividade motora e o superior interesse exploratório em relação aos animais que receberam somente o tratamento com Bz.

AGRADECIMENTOS

À chefe do Laboratório de Biologia Celular, Doutoras Maria de Nazaré Soeiro e Solange Lisboa de Castro, pelo apoio estrutural e à Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo suporte financeiro. Aos órgãos financiadores: Fundação Oswaldo Cruz e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

REFERÊNCIAS

1. Araújo-Jorge TC, de Castro SL. *Questões da doença humana para trabalho em modelos animais*. In: Araújo-Jorge TC & de Castro SL. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro, 102-112, 2000.
2. Batista D da G, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, Junqueira A, Lima MM, Romanha AJ, Sales Junior PA, Stephens CE, Boykin DW, Soeiro Mde

- N. Arylimidamide DB766, a potential chemotherapeutic candidate for Chagas' disease treatment. *Antimicrob Agents Chemother* 54: 2940-2952, 2010.
3. Brener Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 4: 386-396, 1962.
 4. Botoni FA, Poole-Wilson PA, Ribeiro AL, Okonko DO, Oliveira BM, Pinto AS, Teixeira MM, Teixeira AL Jr, Reis AM, Dantas JB, Ferreira CS, Rocha MO. A randomized trial of carvedilol after renin-angiotensin system inhibition in chronic Chagas cardiomyopathy. *Am Heart J* 4: 1-8, 2007.
 5. Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop* 115: 5-13, 2010.
 6. Coura JR. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop* 39: 113-117, 2006.
 7. *Consenso Brasileiro em Doença de Chagas*. Secretária de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde. *Rev Soc Bras Med Trop* 3:12-15, 2006.
 8. da Silva DR, de Castro SL, Alves MCS, Batista WS, Oliveira GM. Acute experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Establishing a murine model that utilises non-invasive measurement of disease parameters. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 107: 211-216, 2012.
 9. Danilov SM, Faerman AI, Printseva OY, Martynov AV, Sakharov IY, Trakht IN. Immunohistochemical study of angiotensin-converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 87: 487-490, 1987.
 10. DataSUS – Ministério da Saúde – Brasil. Base de dados do Ministério da Saude, 2008 Disponível em: <http://w3.datasus.gov.br/datasus/datasus.php>. Acesso em 08/06/2011.
 11. de Oliveira GM, Yoshida N, Higa EM, Shenkman S, Alves M, Staquicini D, Cascabulo C, Schor N. Induction of proinflammatory cytokines and nitric oxide by *Trypanosoma cruzi* in renal cells. *Parasitol Res* 109: 483-491, 2011.
 12. Dias J, Coura J. *Epidemiologia*. In: Dias J & Coura J. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico terapêutico. Editora Fiocruz. Rio de Janeiro, 1997. p. 85-94.
 13. Dias JC, Prata A, Correia D. Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop* 41: 193-196, 2008.
 14. Dias JC, Amato Neto V, Luna EJ. Alternative transmission mechanisms of *Trypanosoma cruzi* in Brazil and proposals for their prevention. *Rev Soc Bras Med Trop* 3: 375-379, 2011.
 15. Keeney A, Jessop DS, Harbuz MS, Marsden CA, Hogg S, Blackburn-Munro RE. Differential effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic–pituitary–adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. *J Neuroendocrinol* 18: 330-338, 2006.
 16. Kaluff AV, Fox MA, Gallagher PS, Murphy DL. Hypolocomotion, anxiety and serotonin syndrome-like behavior contribute to the complex phenotype of serotonin transporter knockout mice. *Genes Brain Behav* 6: 389-400, 2007.
 17. Leon JS, Wang K, Engman DM. Captopril ameliorates myocarditis in acute experimental Chagas disease. *Circulation* 107: 2264-2269, 2003.
 18. Le Loup G, Pialoux G, Lescure FX. Update in treatment of Chagas disease. *Curr Opin Infect Dis* 5: 428-434, 2011.
 19. Lenzi H, Oliveira D, Lima M. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol* 84: 16-27, 1996.
 20. Melo C, Brener Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *J Parasitol* 64: 475-482, 1978.
 21. Meira WS, Galvão LM, Gontijo ED, Machado-Coelho GL, Norris KA, Chiari E. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *J Clin Microbiol* 2: 707-712, 2004.
 22. Moncayo A, Silveira AC. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 17-30, 2009.

23. Oliveira G, Masuda M, Rocha N, Schor N, Hooper C, Araújo-Jorge TC, Henriques-Pons A. Absence of Fas-L aggravates renal injury in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 1063-1067, 2009.
24. Oliveira GM, Silva T, Batista W, Franco M, Schor N. Acute *Trypanosoma cruzi* experimental infection induced renal ischemic/reperfusion lesion in mice. *Parasitol Res* 106: 111-120, 2009.
25. Oliveira GM, Alves MSC, da Silva DR, Batista WS, Schor N. Cardio/Renal interaction during the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Angiotensin II, AT1 receptor, aldosterone inhibition and mortality rate. In press 2012, *J Exp Integr Med*.
26. Pinto Y, Valente A, Valente C. Emerging acute Chagas' disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. *Braz J Infect Dis* 8: 454-460, 2004.
27. *Portal de Doença de Chagas* – Fundação Oswaldo Cruz. Rev Eletr Pidc 1, 2006. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/chagas/>. Acesso em 17/04/2011.
28. Ramires JA, Salemi V, Ianni B, Fernandes F, Martins DG, Billate A, Neto EC, Mady C. Aldosterone Antagonism in an Inflammatory State: Evidence for Myocardial Protection. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 7: 162-165, 2006.
29. Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, Juliano L, Müller-Esterl W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med* 192: 1289-3000, 2000.
30. Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. *Trends Parasitol* 22: 583-588, 2006.
31. van den Borne SW, Isobe S, Zandbergen HR, Li P, Petrov A, Wong ND, Fujimoto S, Fujimoto A, Lovhaug D, Smits J, Daemen M, Blankesteijn W, Reutelingsperger C, Zannad F, Narula N, Vannan M, Pitt B, Hofstra L, Narula J. Molecular imaging for efficacy of pharmacologic intervention in myocardial remodeling. *JACC Cardiovasc Imaging* 2: 187-198, 2009.

PRÓXIMOS EVENTOS NA ÁREA DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA
MEETINGS TO BE HELD ON THE AREA OF TROPICAL PATHOLOGY AND PUBLIC HEALTH

The ASEAN Congress of Tropical Medicine and Parasitology, de 15 a 17 de maio de 2012, Manila/Filipinas. Informações: Dr. Lydia R. Leonardo. Chair, Organizing Committee of Fifth ACTMP. E-mail: 5thactmp@gmail.com

VI Congresso da Sociedade Paulista de Parasitologia, de 13 a 15 de julho de 2012, Pindamonhangaba, SP. Informações: parasito@congressoparasito2012.com

64ª. Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC), de 22 a 27 de julho de 2012, São Luiz, MA. Informações: <http://www.sbpnet.org.br/saoluis/home/>

XVIII International Congress for Tropical Medicine and Malaria and XLVIII Congress of the Brazilian Society for Tropical Medicine, Rio de Janeiro, 23 to 28th September 2012. Informações: <http://ictmm2012.ioc.fiocruz.br/index.html>

XXVIII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia e XXXIX Reunião Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, de 1 a 3 de outubro de 2012, Caxambu, MG. Informações: <http://www.sbpz.org.br/>

XXII Encontro Nacional de Virologia e VI Encontro de Virologia do MERCOSUL, de 23 a 26 de outubro de 2012, Atibaia-SP. Informações: http://sbv.dominiotemporario.com/web2/enc_nac_virologia2012/index.html

XXI Congresso Latino-Americano de Microbiologia - CLAM 2012, de 28 de outubro a 1 de novembro de 2012, Santos, SP. Informações: <http://www.sbmicrobiologia.org.br/Latino/>

X Congresso Brasileiro de Saúde Coletiva de 14 a 18 de novembro de 2012, Porto Alegre, RS. Informações: http://www.abrasco.org.br/noticias/noticia_int.php?id_noticia=725

XXIII Congresso Brasileiro de Parasitologia, de 22 a 27 de outubro de 2013, Florianópolis, SC. Informações: www.parasitologia.org.br