



Eficácia de medicamentos no controle da infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em ratos

Medicines effectiveness for the control of the experimental infection by *Trypanosoma evansi* in rats

Rovaina Laureano Doyle¹, Aleksandro Schafer da Silva², Sílvia González Monteiro³, Janio Morais Santurio³ & Dominguita Lühers Graça⁴

RESUMO

Trypanosoma evansi é um protozoário de distribuição geográfica mundial, sendo detectado na corrente sanguínea de várias espécies de mamíferos, os quais podem sofrer a doença ou simplesmente serem reservatório para o parasito. O objetivo deste experimento foi verificar a eficácia de três medicamentos no controle de infecção experimental por *Trypanosoma evansi* em *Rattus norvegicus*. Foram utilizados 40 ratos, machos e fêmeas, divididos em quatro grupos com 10 animais cada. O grupo A foi composto de animais infectados, mas não tratados, os grupos B, C e D foram tratados com três quimioterápicos distintos, oxitetraciclina, benzonidazol e aceturato de diminazeno, respectivamente. O tratamento foi instituído após a detecção de parasitemia superior a oito tripomastigotas por campo no esfregaço sangüíneo. As avaliações foram feitas por contagens diárias de hemoparasitas no esfregaço sangüíneo. Os tratamentos instituídos aos grupos B e C não combateram a infecção pelo protozoário, no entanto, o tratamento administrado aos animais do grupo D foi o mais eficaz no controle da parasitemia, sendo observado longevidade dos roedores de 36 dias, em média, após o tratamento. Nenhum dos medicamentos avaliados proporcionou a cura da enfermidade.

Descritores: oxitetraciclina, benzonidazol, diminazeno, *Trypanosoma evansi*.

ABSTRACT

Trypanosome evansi is a protozoan of global geographic spread detected in the blood current of several species of mammals which may suffer the disease or simply act as a reservoir for the parasite. The present trial had the purpose of verifying the effectiveness of three medicines on controlling the experimental infection by *Trypanosome evansi* in *Rattus norvegicus*. Forty male and female rats have been used and they were separated in four groups of 10 animals. The group A has been composed of infected but not treated animals; the groups B, C and D were treated with three different chemotherapeutics: oxitetracycline, benzonidazol and diminazene aceturate, respectively. The treatment was established after detecting a parasitemy superior to eight trypomastigotes per field in the blood scrubbing. The evaluations have been accomplished by daily counts of hemoparasites in the blood scrubbing. The treatments established to the groups B and C did not combat the infection by the protozoan, however, the treatment managed to the animals of the group B was the most effective on controlling the parasitemy with the rodents being observed to present longevity of 36 days, in average, after treatment. None of the evaluated medicines have provided the cure for the illness.

Key words: Oxitetracycline, benzonidazol, diminazene, *Trypanosome evansi*.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma evansi é um protozoário digenético da seção salivaria, agente etiológico da doença conhecida como mal das cadeiras em equínos [16]. É geralmente monomórfico, tem um pequeno cinetoplasto subterminal, embora existam formas como as cepas brasileiras, comprovadamente acinetoplásticas [18]. Tem distribuição geográfica mundial, sendo comumente observado parasitando o sangue de cavalos, camelos, burros, bovinos, caprinos, suínos, cães, búfalos, elefantes, capivaras, quatis, antas, veados, pequenos roedores silvestres e o homem [7,16]. Os tripomastigotas presentes nos vasos sanguíneos de vertebrados são transmitidos por insetos hematófagos (Tabanídeos) durante o repasto sanguíneo [16].

O aceturato de diminazeno é o produto mais comumente utilizado no controle das tripanossomíases dos animais domésticos, além de ser ativo contra tripanossomas que são resistentes a outros medicamentos [12]. A oxitetraciclina é um antibiótico de largo espectro derivado do *Streptomyces rimosus* eficaz sobre uma variedade de germes gram-positivos e gram-negativos, micoplasmas, clamídias e rickettsias como *Ehrlichia* e *Anaplasma*, sendo freqüentemente usada em formulações comerciais associada ao aceturato de diminazeno no tratamento de tripanossomíases [2]. Benzoni-dazol é indicado para o controle da doença de Chagas humana, ativo contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas, sendo hoje o único medicamento

ativo contra *Trypanosoma cruzi* disponível para uso clínico no Brasil nas formas aguda e crônica desta enfermidade [5]. O objetivo deste experimento foi verificar a eficácia de três diferentes medicamentos no controle de uma infecção experimental de *T. evansi* em *Rattus norvegicus*.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado no Laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria, onde foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) da linhagem wistar, machos e fêmeas entre 3 e 4 meses de idade, pesando em média 300g. Os roedores foram divididos em 4 grupos de 10 animais (A, B, C e D), sendo cada grupo composto por cinco machos e cinco fêmeas separados em oito gaiolas ao todo. Os roedores foram alimentados diariamente com ração comercial e água à vontade. Os ratos do experimento foram inoculados, via intraperitoneal, com $2,72 \times 10^6$ tripomastigotas por animal de uma cepa de campo, isolada de cão infectado naturalmente com *T. evansi* [4], mantido em laboratório sob cultura viva em ratos wistar (Figura 1).

Os ratos foram diariamente avaliados, através da pesquisa microscópica de esfregaço do sangue, coletado da veia da cauda de cada animal, sendo corado por Panótico Rápido® e observado ao microscópio de luz em imersão.

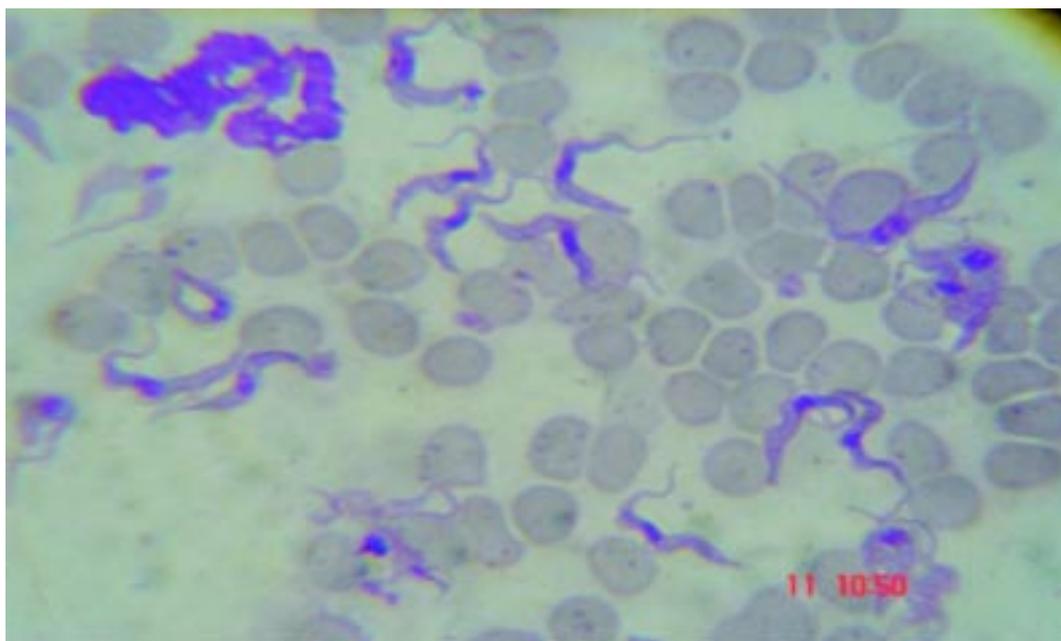


Figura 1. Esfregaço sanguíneo de ratos com a forma tripomastigota do *Trypanosoma evansi*.

Os tratamentos foram instituídos e mantidos quando os animais apresentavam oito ou mais tripomastigotas por campo visualizados na lâmina do esfregaço sanguíneo. O grupo A foi composto por animais infectados, mas não tratados. Já os animais do grupo B foram tratados com oxitetraciclina a 10% na dose de 30mg/kg peso vivo via intramuscular em terapia diária. Os comprimidos de benzonidazol foram triturados e dissolvidos em solução glicosada estéril a 20%, resultando em uma suspensão com 25,6mg/ml a qual foi administrada na dose de 10,24mg por animal em duas administrações diárias pela via oral (12x12 hs), nos ratos do grupo C. Já os roedores do grupo D foram medicados com aceturato de diminazeno na dose de 3,5 mg/kg de peso vivo pela via intramuscular.

Os animais mortos foram necropsiados, sendo coletados fragmentos de fígado, baço, rim, glândula adrenal, olho e coração [9]. Todos os fragmentos foram colocados em formol tamponado a 10% e processados histologicamente para análise no Laboratório de Patologia Veterinária da Universidade Federal de Santa Maria.

Os resultados foram avaliados através da análise de variância (ANOVA) para verificar a longevidade dos ratos, machos e fêmeas, dos três tratamentos em relação ao grupo controle. Foi aplicado o teste de TUKEY para comparação entre as médias, calculando-se o coeficiente de variação [15].

RESULTADOS

O período pré-patente, compreendido desde a infecção até a detecção dos tripomastigotas no sangue periférico, não demonstrou variação significativa entre grupos tratados e machos e fêmeas da cada grupo, sendo em média de 1,6 dias (Tabela 1).

O período de sobrevivência dos animais após o tratamento, ou seja, desde o início da administração dos medicamentos até a morte do animal ou encerramento do experimento, apresentou diferença significativa tanto entre machos e fêmeas quanto entre os grupos tratados. Os animais do grupo controle (A) sobreviveram em média 3,2 dias após infecção. Os animais do grupo B, tratado com oxitetraciclina apresentaram uma longevidade de 3,8 dias em média, os ratos do grupo C, tratado com benzonidazol sobreviveram em média 9,8 dias após o início do tratamento, enquanto os roedores do grupo tratado com aceturato de diminazeno apresentaram longevidade em média de 28,8 e 43,2 dias, machos e fêmeas, respectivamente (Tabela 1).

Os ratos infectados não apresentaram sinais clínicos aparentes durante a parasitemia, entretanto apresentaram-se prostrados algumas horas antes da morte. Durante a necropsia, todos os animais infectados apresentaram esplenomegalia de grau variado. Um dos animais deste experimento apresentou hemorragia pulmonar e outro apresentou a bexiga com conteúdo hemorrágico.

Nas avaliações histopatológicas não foram encontradas formas tripomastigotas do *T. evansi* nos vasos viscerais devido à fragilidade destas formas ao processamento histológico. Ao exame microscópico, os órgãos apresentaram-se congestionados e, principalmente o fígado e pulmão, com infiltrado linfoplasmocitário multifocal, discreto a moderado, com alguns polimorfonucleares eosinófilos. O baço apresentou hemossiderose discreta, enquanto nos linfonodos foram observados numerosos plasmócitos, tanto no córtex, paracórtex e cordões medulares. Um dos animais apresentou pneumonia supurativa subaguda.

Tabela 1. Média das avaliações dos diferentes tratamentos em machos e fêmeas de ratos experimentalmente infectados por *T. evansi* quanto ao período pré-patente e longevidade dos animais a partir do tratamento.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D
<i>Período pré-patente (dias)</i>				
Machos	1,0 ^a	1,0 ^a	1,0 ^a	3,0 ^a
Fêmeas	1,0 ^a	1,2 ^a	1,2 ^a	2,0 ^a
<i>Longevidade após tratamento (dias)</i>				
Machos	-	3,2 ^b	6,4 ^b	28,8 ^c
Fêmeas	-	4,6 ^b	13,2 ^b	43,2 ^d

Médias seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente diferentes entre si, à nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Grupo A: não tratado.

DISCUSSÃO

Período pré-patente semelhante ao deste estudo já foi relatado em outro trabalho, onde a infecção em ratos pelo *T. evansi* ocorreu em média 1,5 dias após a inoculação de 10^1 e 10^3 tripomastigotas por grama de peso vivo [13].

Os animais do grupo controle (A) apresentaram longevidade de 3,2 dias, resultados semelhante foi observado por pesquisadores, onde os ratos sobreviveram de 2 a 6 dias após infecção [11]. Os roedores do grupo tratado com aceturato de diminazeno apresentaram longevidade superior aos animais dos demais grupos, esta diferença entre os tratamentos ocorreu porque o aceturato de diminazeno é o medicamento mais indicado contra tripanosomíase animal [12].

A oxitetraciclina na dose utilizada não teve ação sobre a infecção pelo *T. evansi*, apesar deste princípio ativo ser recomendado para o tratamento de enfermidades causadas por protozoários [17], sendo frequentemente utilizada em formulações comerciais associada ao aceturato de diminazeno no tratamento de tripanosomíases [2], possivelmente devido à falta de diagnóstico das hemoparasitoses a campo. O tratamento dos animais do grupo B pode não ter sido eficaz devido na causar interferência da síntese protéica do *T. evansi*, pois é onde o medicamento atua [2].

Conforme literatura o benzonidazol é hoje o único medicamento ativo contra *Trypanosoma cruzi* disponível para uso clínico no Brasil [5], sendo eficaz nas formas aguda e crônica, no entanto, na dose utilizada neste estudo não teve eficácia, apesar de prolongar a morte dos animais parasitados em comparação aos animais do grupo A e B.

O período de tratamento apresentou reincidência no grupo tratado com aceturato de diminazeno, uma vez que os tripomastigotas eram eliminados da corrente sanguínea em até dois dias depois de tratados, sendo que a infecção retornou após 15 e 30 dias. Esta reincidência foi relatada por autores que sugerem

que os medicamentos anti-tripanosoma mais recentes, não ultrapassam a barreira hemato-encefálica em doses suficientes, sendo esta, uma possível área de refúgio dos tripanossomas durante o período de atuação sistêmica do medicamento [8].

A rápida queda da parasitemia após a administração de aceturato de diminazeno deve-se à sua rápida distribuição sanguínea. A literatura afirma que uma hora após a injeção intramuscular, este medicamento atinge 75% do plasma, onde seus resíduos circulantes permanecem por 21 dias [10].

Neste estudo os animais infectados apresentaram esplenomegalia, alteração essa também encontrada em outros experimentos [6], testando a eficácia de dois medicamentos contra *T. evansi*, onde observaram acentuada esplenomegalia, em ratos infectados por uma cepa recém isolada de camelos, chegando a triplicar o tamanho do baço, também observaram congestão leve no coração, fígado e rins, sinais não observados nesse experimento. A hemorragia pulmonar e bexiga com conteúdo hemorrágico observados neste estudo ocorreram provavelmente por alterações hemostáticas, comumente associadas às tripanosomíases [3].

Alterações histopatológicas semelhantes ao deste trabalho foram descritas em outros estudos [1,6], como alterações inflamatórias no fígado e pulmões, lesões degenerativas no baço, necrose e substituição por células inflamatórias mononucleares no fígado e alterações gordurosas no baço em ratos. Também foi verificada a presença de infiltrado de linfócitos e plasmócitos nos linfonodos, baço, cérebro pâncreas e outros órgãos de animais infectados por *T. brucei* [14].

CONCLUSÃO

A oxitetraciclina e benzonidazol não foram eficientes no tratamento da infecção por *T. evansi* em ratos nas doses administradas. O medicamento aceturato de diminazeno foi eficaz no controle da infecção por *T. evansi* em ratos, sem promover a total eliminação do protozoário.

REFERÊNCIAS

- 1 **Biswas D., Choudhury A. & Misra K.K. 2001.** Histopathology of *Trypanosoma* (Trypanozoon) *evansi* infection in bandicoot rat. I. visceral organs. *Experimental Parasitology*. 99: 148-159.
- 2 **Brander G.C. Pugh D.M., Bywater R.J. & Jenkins W.L. 1991.** *Veterinary Applied Pharmacology & Therapeutics*. 5ed. Ballière Tindall/Saunders, Toronto. 624p.
- 3 **Brandão L.P., Larsson M.H.M.A., Birgel E.H., Hagiwara M.K., Ventura R.M. & Teixeira M.M.A. 2002.** Infecção natural pelo *Trypanosoma evansi* em cão – Relato de caso. *Clínica Veterinária*. 36: 23-26.

- 4 **Colpo C.B., Colpo E.T.B., Stainki D.R. & Monteiro S.G. 2005.** Infecção natural por *Trypanosoma evansi* em cão no Rio Grande do Sul. *Ciência Rural*. 35: 717-719.
- 5 **Dias J.C.P. & Coura J.R. 1997.** *Clínica e terapêutica da doença de chagas: Uma abordagem prática para o clínico geral.* Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ, 486p.
- 6 **Haroun E.M., Mitnawi T., Omer O.H., Ali B.H. & Mahmoud O.M. 2003.** A preliminary comparative study on the efficacy of quinapyramine sulphate/chloride and melarsoprol in rats, experimentally infected with *Trypanosoma evansi*. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*. 6: 215-221.
- 7 **Joshi P.P., Shegokar V.R., Powar R.M., Herder S., Katti R., Salkar H.R., Dani V.S., Bhargava A. & Jannin J. 2005.** Human trypanosomosis caused by *Trypanosoma evansi* in India: The first case report. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 73: 491-495.
- 8 **Kaminsky R. & Brun R. 1998.** *In vivo* and *In vitro* activities of trybazine hydrochloride against various pathogenic trypanosome species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42: 2858-2863.
- 9 **Luca R.R., Alexandre S.R., Marques T., Souza L.P., Merusse J.L.B. & Neves S.P. 1996.** *Manual para Técnicos em Bioterismo.* 2ed. São Paulo: Winner Graph, 259p.
- 10 **Miller D.M., Swan G.E., Lobetti R.G. & Jacobson L.S. 2005.** The pharmacokinetics of diminazene aceturate after intramuscular administration in healthy dogs. *Journal of the South African Veterinary Association*. 76: 146-150.
- 11 **Oliveira T.C.G.** Comportamento do *Trypanosoma evansi* (*T. equinum*) em animais de laboratório. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 41: 271-277.
- 12 **Peregrine A.S. & Mamman M. 1993.** Pharmacology of Dimenazene: A Review. *Acta Tropical*. 54: 185-203.
- 13 **Queiroz A.O., Legey A.P., Xavier S.C.C. & Jansen A.M. 2001.** Specific antibody levels and antigenic recognition of wistar rats inoculated with distincts isolates of *Trypanosoma evansi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96: 965-972.
- 14 **Rue M.L. 1996.** Alterações hematológicas e bioquímicas em cães infectados com *Trypanosoma evansi* (STEEL, 1885) BALBIANI, 1888. 71f. Porto Alegre, RS. Dissertação (Doutorado em Microbiologia Clínica). Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 15 **Silva, F.A.S. & Azevedo C.A.V. 2002.** Versão do programa computacional Assistat para o sistema operacional Windows. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 4: 71-78.
- 16 **Silva R.A.M.S., Seidl A., Ramirez L. & Dávila A.M.R. 2002.** *Trypanosoma evansi* e *Trypanosoma vivax* – Biologia, Diagnóstico e Controle. *Manual EMBRAPA Online*. Disponível em: <http://www.cpap.embrapa.br/publicacoes/online/Livro015>. Acessado em 01/2005.
- 17 **Spinosa H.S., Gorniak S.L. & Bernardi M.M. 1999.** *Farmacologia aplicada à veterinária.* 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 489p.
- 18 **Ventura R.M., Takata C.S.A. & Nunes V.L.B. 2000.** Molecular and morphological studies of brazilian *Trypanosoma evansi* stocks: The total absence of kdna in trypanosomes from both laboratory stocks and naturally infected domestic and wild mammals. *Journal of Parasitology*. 86: 1289-1298.