

ALTERAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE MEDIADA POR CÉLULAS DURANTE O TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL ¹

Antônio R L Teixeira, Eliane Jabur, José Carlos Córdoba, Inês C Souto Maior,
Edwin Solórzano

Coelhos inoculados com tripomastigotas da cepa Ernestina do Trypanosoma cruzi tiveram parasitemias, demonstradas pelo xenodiagnóstico, até cinco meses e meio após a infecção. O tratamento de alguns desses coelhos com benzonidazol, na dose de 8mg/kg durante sessenta dias, após dois meses de infecção, resultou na negatificação dos xenos após 30 dias de uso da medicação. Os coelhos chagásicos crônicos, após seis meses de infecção, já tinham a parasitemia subpatente quando foram submetidos a tratamento idêntico àqueles da fase aguda. Em ambos os casos, os coelhos tratados com benzonidazol tiveram títulos de anticorpos humorais semelhantes àqueles verificados nos coelhos chagásicos não-tratados, inclusive durante a quimioterapia. A não alteração da imunidade humoral em coelhos tratados foi comprovada quando animais chagásicos e não chagásicos submetidos ao tratamento produziram títulos de anticorpos hemolíticos idênticos àqueles verificados nos animais não-tratados.

Em acentuado contraste, a função imune timo-dependente foi severamente alterada pelo uso do benzonidazol. As reações de hipersensibilidade tardia contra um antígeno sub-celular do T. cruzi foram suprimidas durante a vigência do tratamento dos coelhos chagásicos. Paralelamente, estas reações eram intensas nos coelhos chagásicos não-tratados e negativas em coelhos controles normais. Todavia, as reações cutâneas tornaram-se novamente positivas 10 dias após o tratamento. Foi interessante notar que as reações de hipersensibilidade tardia in vivo, em coelhos imunizados com BCG e testados com PPD ou em coelhos sensibilizados com DNCB também foram suprimidas durante o tratamento com o benzonidazol. Contudo, as reações de imunidade celular contra estes antígenos também reverteram aos valores normais 7 a 10 dias após a suspensão do benzonidazol.

Resultados semelhantes foram relatados em relação ao nifurtimox, outra droga utilizada no tratamento da doença de Chagas. O benzonidazol e o nifurtimox são compostos nitro-aromáticos cuja nitrorredução resulta na formação de metabólitos intermediários potencialmente citotóxicos para o protozoário e para as células do hospedeiro.

(Palavras-chaves. Benzonidazol. Imunossupressão. Resposta imune celular. Linfócitos T. Doença de Chagas. Trypanosoma cruzi. Coelhos.)

Em 1944, Dodd e Stillman ¹⁸ publicaram um trabalho sobre a eficiência da nitrofurazona (5 nitro – 2 – furaldeído semicarbazona) como agente antibacteriano. Em 1946, Dodd ¹⁷ des-

creveu o efeito curativo da nitrofurazona contra a infecção experimental com o *Trypanosoma equiperdum*. A partir de então, um grande número de compostos nitro-derivados foram

¹ Trabalho do Laboratório de Imunopatologia, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, 70.910 Brasília, Brasil. Realizado com recursos do Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais WHO/UNDP/World Bank, e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

Recebido para publicação em 21/12/82

sintetizados, visando à quimioterapia anti-microbiana. Os nitro-derivados empregados na medicina humana e veterinária formam uma grande família de compostos nitro-aromáticos, que inclui os 5-nitrofuranos, 5-nitroimidazólicos, 2-nitroimidazólicos, 5-nitrotiazólicos, nitrobenzenos e outros derivados nitro-heterocíclicos.

O uso de nitrofuranos na quimioterapia experimental da doença de Chagas foi iniciado, em 1952, por Manso Soto e Lopetegui²⁶, que verificaram a ausência de atividade do nitrofurfural diacetato, e por Packchianian³¹, que encontrou efeito supressivo em seis compostos nitrofuranos contra infecção experimental de camundongos pelo *Trypanosoma cruzi*. Em 1957, este último autor testou a atividade de 47 compostos nitrofuranos, tendo encontrado 33 destituídos de atividade, seis com alguma atividade, quatro com ação supressiva moderada da parasitemia, e quatro deles com efeito supressivo sobre a parasitemia, um dos quais era a nitrofurazona³². Em 1961, Brener³ empregou a nitrofurazona, por tempo prolongado, para tratar a doença de Chagas experimental de 65 camundongos, tendo comprovado a persistência da parasitemia em apenas três animais. Ainda, neste mesmo ano, Brener⁴ observou a atividade da furadantina [N-(5-nitro-2-furfurilideno-1-aminohidantoína)], da furaltadona (5-nitro furfurilideno-amino-2-oxazolidona), e da furazolidona [N-(5-nitrofurfurilideno)-3-amino-3-oxazolidona], na dose de 100mg/kg, durante 52 dias consecutivos, contra a infecção experimental de camundongo pelo *T. cruzi*. Destes três últimos 5-nitrofuranos, a furazolidona apresentou o melhor resultado, tendo suprimido a parasitemia em 86,7% dos animais submetidos a um xenodiagnóstico.

A partir de estudos que relacionaram a atividade da droga à sua estrutura química, Bock e cols¹ verificaram que o nifurtimox [4-(5-nitrofurfurilideno-amino)-tetrahydro-4-H-1,4-tiazina-1, 1-dióxido] era mais ativo contra o *T. cruzi* que os demais nitrofuranos. Este composto tem sido usado no tratamento da doença de Chagas, principalmente na Argentina, dotado que é de efeito supressivo sobre a parasitemia^{6-10 35 37}.

Outros compostos nitro-aromáticos, os derivados nitroimidazólicos, também foram exaustivamente investigados quanto à atividade anti-tripanicida. Pizzi, em 1961 verificou acentuada ação supressiva do metronidazol [1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol], usado largamente

para tratar infecções por *Trichomonas vaginalis*³³. Porém, de uma série de compostos nitroimidazólicos testados, verificou-se que o benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida) é o mais eficiente no tratamento da doença de Chagas experimental^{19 34}. Esta droga tem sido usada largamente no tratamento da doença de Chagas humana.

A partir de 1974 tem surgido na literatura científica todo um corpo de evidências indicando que a auto-imunidade tem um papel importante na patogenia das lesões cardíacas^{12 13 36 39 44} e digestivas⁴⁶, encontradas nos indivíduos que falecem da doença de Chagas. Estas observações^{12 13 36 39 41 44 46} indicam que a auto-agressão no chagásico deve estar relacionada à mecanismos de imunidade celular, produzidos por estimulação antigênica continuada. Com base neste raciocínio, Teixeira⁴⁰ postulou que o tratamento com drogas supressivas da parasitemia deveria melhorar o prognóstico do chagásico, porque haveria a possibilidade de impedir a instalação de lesões irreversíveis, de caráter auto-imune, induzidas e perpetuadas pela estimulação antigênica persistente do *T. cruzi*. Este postulado foi robustecido com a observação prévia de Lelchuck e cols.²³, demonstrando que os pacientes chagásicos tratados com nifurtimox (10mg/kg/dia/2 meses) tinham alteração da resposta imune mediada por células, detectável pelo teste de inibição da migração das células mononucleares do sangue.

Com base nestes elementos, nós iniciamos estes experimentos com a finalidade de verificar o efeito que o tratamento com benzonidazol determinaria na evolução da doença de Chagas experimental. Esta verificação pode ser feita porque já dispomos de um modelo animal da doença humana^{43 45}, no qual se conhece a evolução natural da infecção produzida experimentalmente.

Este trabalho, primeiro de uma série de publicações sobre o assunto, descreve a supressão da imunidade celular, em coelhos imunizados com BCG ou sensibilizados com DNCB, durante a vigência do tratamento com doses terapêuticas do benzonidazol.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Infecção de coelhos com tripomastigotas da cepa Ernestina do *T. cruzi*

Vinte e quatro coelhos brancos Nova Zelândia, quatorze fêmeas e dez machos de dois

meses de idade foram inoculados por via intra-peritoneal com 10×10^6 tripomastigotas da cepa Ernestina do *T. cruzi*. Esta cepa foi isolada em 1964, de uma criança de São Felipe-Bahia, que tinha a infecção aguda³⁰. O *T. cruzi* isolado pelo xenodiagnóstico foi levado para o Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos e mantido em cultura de tecido de embriões bovinos. Desde 1976 a cepa Ernestina tem sido mantida, no nosso laboratório, em cultura de células musculares de fetos de coelhos. As formas tripomastigotas oriundas destas culturas foram usadas para infectar três grupos (A, B e C) de oito coelhos, usados nestes experimentos. Mais oito coelhos foram mantidos como controles, não-infectados (grupo D). Todos os coelhos foram alimentados com ração comercial e água *ad libitum*.

2. Determinação da parasitemia

A parasitemia nos grupos de coelhos A, B e C foi determinada pelo xenodiagnóstico. Cada xeno consistiu de 15 ninfas de primeiro estágio de *Dipetalogaster maximus*, que sugavam os animais infectados. Os xenos foram feitos de cinco em cinco dias durante o primeiro mês de infecção, de 15 em 15 dias até o sexto mês e de 30 em 30 dias nos meses subseqüentes. Trinta e sessenta dias após o repasto, as fezes dos triatomíneos eram examinadas ao microscópio. As curvas de parasitemia foram traçadas, plotando-se na abscissa o tempo de infecção e na ordenada o percentual obtido pelo número de barbeiros positivos/número de barbeiros examinados $\times 100$.

3. Imunização de coelhos com BCG e DNCB

Doze coelhos machos e fêmeas de dois meses de idade foram usados nestes experimentos. Seis deles (grupo E) foram imunizados com 0,5 ml de BCG (Fundação Atauilho de Paiva, Rio de Janeiro) via intramuscular. Uma dose de reforço foi injetada 30 dias depois, pela mesma via. Os seis coelhos restantes foram sensibilizados com dinitroclorobenzeno (DNCB, Sigma). Isto consistiu na aplicação de 50 μ l de uma solução de DNCB a 10% em acetona (p/v), na face interna da orelha direita do animal, com o cuidado de deixar a acetona evaporar sobre o local onde a solução era colocada. Desta forma, obtinha-se a formação de uma reação inflamatória local. Este procedimento foi repetido mais uma vez e a inflamação produzida, de maior

intensidade, resultava na formação de crosta, antes de evanescer.

4. Imunização de coelhos com estroma de hemácias de carneiro

Hum mil e quinhentos ml de sangue venoso de cinco carneiros foi coletado em anticoagulante, sob condições estéreis. Após centrifugação e lavagem em salina isotônica as hemácias foram lisadas em 1 litro de água destilada gelada, previamente acidificada com 5 ml de ácido acético glacial, conforme foi descrito por Mayer²⁷. O estroma obtido foi lavado em tampão acetato 1 mM, pH 5,0, e depois de suspenso em salina 0,15M foi aquecido até a fervura por 1 hora. Após o esfriamento, foi determinado o teor de proteínas do estroma pelo método de Lowry e cols.²⁵ e ajustado para a concentração de 1 mg/ml. O esquema de imunização, realizado nos coelhos dos grupos A, C, D, E e F, consistiu na injeção do antígeno pela veia marginal da orelha, como segue: primeiro dia, 0,1 ml; do segundo ao quarto dia, 1 ml; e do quinto ao décimo dia, 2 ml. Todos os coelhos imunizados foram sangrados por punтура cardíaca no 15º dia, e os soros obtidos estocados a -20°C .

5. Imunidade humoral

5.1 – Anticorpos contra *T. cruzi*

Amostras de soros foram obtidas semanalmente de todos os animais, durante o primeiro mês de infecção. A partir de então, os soros eram obtidos de 15 em 15 dias até o sexto mês, e de 30 em 30 dias nos meses subseqüentes. Os títulos de anticorpos nos soros foram determinados pelo teste de aglutinação direta de formas espimastigotas do parasito, tripsinizado e morto pela adição de formol a 1% (v/v). Foi usado o método de microtitulação em placas (Laboratório Dynatech, EUA), e os resultados acima de 1:64 foram considerados como devidos a anticorpos específicos contra *T. cruzi*⁴⁸.

5.2 – Anticorpos hemolíticos

O procedimento usado para titulação dos anticorpos hemolíticos, nos soros dos coelhos imunizados com estroma de hemácias de carneiro, foi aquele descrito por Mayer²⁷. Os soros foram inativados a 56°C durante 30 minutos e suas diluições foram incubadas com suspensão de hemácias frescas de carneiro, seguido

da adição de 5CH₅₀ de complemento de coelho. Controles duplos foram incluídos para cada soro. A leitura foi procedida após 1 hora de incubação a 37°C, seguida de 12 horas a 4°C.

6. Imunidade celular

6.1 – Hipersensibilidade tardia contra antígeno do *T. cruzi*

A imunidade mediada por células foi avaliada nos coelhos chagásicos por uma reação cutânea de hipersensibilidade tardia contra um antígeno subcelular do *T. cruzi* (42). O teste cutâneo foi feito a cada 30 dias, durante o curso da infecção. A injeção intradérmica de 50µg de proteína, contida em 0,1ml do antígeno resultava em reação inflamatória local, cujos diâmetros de induração eram registrados após 48 horas.

6.2 – Hipersensibilidade tardia ao PPD e DNCB

A imunidade celular nos coelhos imunizados com BCG (grupo E) foi avaliada pelo teste cutâneo com o antígeno PPD (Divisão Nacional de Pneumologia Sanitária). O teste consistiu na injeção intradérmica de 0,1ml do antígeno e a medida da induração cutânea era feita 48 horas depois.

No grupo F, sensibilizado com DNCB, a sensibilidade de contato à droga foi verificada pela aplicação, na face interna da orelha esquerda do animal, de 50 µl de uma solução de 0,1% de DNCB em acetona (p/v). A aplicação desta solução resultava no aparecimento de eritema (+), eritema e pápula (++); ou de eritema, pápula e crosta (+++).

7. Tratamento com benzonidazol de coelhos chagásicos ou imunizados com BCG e DNCB

Dezesseis coelhos chagásicos dos grupos A e B e mais 12 coelhos imunizados dos grupos E e F foram tratados com benzonidazol (Fig. 1), por via intraperitoneal, durante 60 dias. O benzonidazol (Rochagan, pó, sem adições) nos foi gentilmente fornecido pelo Laboratório Roche. A droga foi suspensa em salina 0,15M e injetada, após agitação vigorosa, na posologia de 8mg/kg de peso do animal.

Os coelhos do grupo A foram tratados na fase aguda, dois meses depois da inoculação do *T. cruzi*, quando a parasitemia era demonstrada

pelos xenos. Os animais do grupo B foram tratados na fase crônica, seis meses depois da inoculação, quando os xenos eram negativos. O grupo C, inoculado com *T. cruzi*, não recebeu tratamento, o mesmo acontecendo com o grupo D, não-infectado. O tratamento foi iniciado no grupo E uma semana após a segunda imunização com BCG, o mesmo acontecendo no grupo F, sensibilizado com DNCB.

RESULTADOS

1. Efeito da quimioterapia específica sobre a parasitemia

Os coelhos dos grupos A, B e C infectados com *T. cruzi* tiveram parasitemias demonstradas pelos xenodiagnósticos. A figura 2 mostra uma curva típica da parasitemia em coelhos infectados, mas não tratados. Com dois meses de infecção 22,5%, dos triatomíneos usados nos xenos mostravam-se positivos ao exame microscópico, com três meses 20% dos triatomíneos ainda ficavam positivos mas com cinco meses apenas 2,5% deles achavam-se positivos. Porém, a partir do 6º mês todos os animais tiveram os xenodiagnósticos negativos. A curva de parasitemia foi bastante modificada nos animais chagásicos do grupo A, que receberam tratamento com benzonidazol. Embora esses animais tivessem positivado 27,5% dos triatomíneos usados nos xenos antes do tratamento, no segundo mês de infecção, 15 dias após o início do tratamento apenas 5% dos triatomíneos usados nos xenos foram positivos, e com 30 dias de tratamento todos os triatomíneos daqueles xenos foram negativos. Daí em diante os demais xenos feitos no curso da infecção persistiram negativos em todos os animais (Fig. 3). Os animais do grupo B já mostravam todos os xenos negativos a partir do sexto mês de infecção, quando foram submetidos à quimioterapia específica.

2. Anticorpos humorais em coelhos tratados com benzonidazol

Os coelhos chagásicos dos grupos A, B e C tiveram títulos elevados de anticorpos demonstrados pelos testes de aglutinação de *T. cruzi*. Em geral, esses anticorpos foram detectados nos soros a partir da segunda semana e alcançaram títulos bem altos a partir de um mês de infecção. A quimioterapia específica iniciada a partir do segundo mês de infecção não resultou em queda dos títulos desses anticorpos. De

fato, os níveis de anticorpos específicos mantiveram-se constantes, com tendência a tornarem-se mais elevados nos meses subsequentes da infecção (Fig. 4). O mesmo fenômeno foi observado no grupo B, tratado na fase crônica, pois não houve queda significativa dos títulos de anticorpos específicos (Fig. 5). Os coelhos chagásicos do grupo C (não-tratados) tiveram níveis de anticorpos séricos similares àqueles dos grupos A e B.

Que a capacidade de produzir anticorpos humorais não é alterada pelo uso de benzonidazol, na posologia empregada neste estudo, foi demonstrada nos animais imunizados com estroma de hemácias de carneiro. Os resultados destes experimentos estão apresentados na Figura 6. Os grupos de coelhos controles normais e de coelhos chagásicos não-tratados produziram anticorpos séricos com títulos semelhantes àqueles produzidos pelos grupos de coelhos chagásicos tratados, e de coelhos imunizados com DNCB ou BCG, que também foram submetidos ao tratamento. Foi interessante notar que os coelhos chagásicos deste estudo sempre tiveram maior concentração de anticorpos heterófilos, capazes de hemolisar hemácias de carneiro na presença de complemento do que os três grupos restantes de animais não chagásicos (Fig. 6). Não obstante, os títulos elevados de anticorpos hemolíticos, induzidos pelo processo de imunização, foram bastante similares em todos os grupos de animais.

3. Alterações da imunidade mediada por células, induzidas pelo benzonidazol

Nestes experimentos, reações cutâneas de hipersensibilidade tardia contra um antígeno do *T. cruzi* foram registradas em todos os animais chagásicos dos grupos A e B. Aos 30 dias após a inoculação do parasito as reações cutâneas dos coelhos do grupo A alcançaram $1,7 \pm 0,9$ cm e aos 60 dias mediam $1,5 \pm 0,8$ cm (Fig. 7). Porém, 28 dias após o início do tratamento (aos 90 dias de infecção) todos os animais já não reagiram à injeção intradérmica do antígeno do *T. cruzi* e os testes continuaram negativos até o fim do tratamento, aos 120 dias de infecção. É interessante notar que os coelhos chagásicos do grupo C continuavam a dar reações intensas contra o antígeno de *T. cruzi*, enquanto que os coelhos controles do grupo D não reagiam ao mesmo antígeno. Todavia, 10 dias após o término do tratamento os coelhos do grupo A voltaram a apresentar reações cutâneas positivas.

Nos coelhos do grupo E, a intensidade das reações obtidas após a primeira imunização foi aumentada após a dose de reforço do BCG, aplicada 30 dias após a primeira. Uma semana após a dose de reforço, a média dos testes cutâneos alcançou $1,7 \pm 0,6$ cm. Porém, 25 dias após o início do tratamento com benzonidazol as reações mediam $0,8 \pm 0,7$ cm e aos 55 dias não foi mais possível obter sequer uma reação cutânea positiva contra o antígeno PPD (Fig. 8). Contudo, uma semana após o término do tratamento as reações cutâneas de hipersensibilidade tardia voltaram a ser positivas.

A confirmação de que o tratamento com benzonidazol altera a resposta imunitária mediada por células foi obtida também nos coelhos do grupo F, sensibilizados com DNCB. (Tabela 1).

Todos os animais apresentaram hipersensibilidade de contato à droga, que variou de 1+ a 3+. Porém, aos 30 dias de tratamento com benzonidazol os coelhos deixaram de reagir àquela concentração do DNCB. Entretanto, como nos grupos anteriores, os animais sensibilizados voltaram a apresentar reação de hipersensibilidade (1+ a 2+), 10 dias após a suspensão da droga.

DISCUSSÃO

O tratamento da infecção chagásica experimental de coelhos com benzonidazol, na posologia de 8mg/kg/dia, durante 60 dias, resultou na abreviação da fase aguda da doença à semelhança do que se tem descrito para a doença humana^{5 14}. O curso natural da parasitemia nos animais infectados teve a duração de cinco meses e meio, como demonstrado pelo xenodiagnóstico. Nos animais submetidos à quimioterapia, aos dois meses da infecção, a parasitemia desapareceu após 30 dias de uso da droga. Depois do tratamento estes animais tiveram os xenos negativos e passaram à fase crônica da infecção também tiveram, igualmente, todos os xenos negativos.

De grande interesse, entretanto, é o fato de que tanto os animais chagásicos tratados, na fase aguda ou na fase crônica da infecção, como os animais chagásicos não tratados mantiveram, similarmente, títulos elevados de anticorpos humorais anti-*T. cruzi*. Como esses anticorpos aglutinaram os parasitos da mesma forma que aqueles presentes nos soros dos coelhos com a infecção aguda, só se pode afirmar que ambos sejam produzidos por células estimuladas por antígenos do *T. cruzi*. Desta forma, do ponto

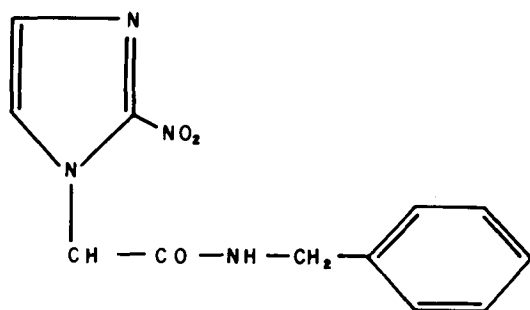


Fig. 1 – Estrutura química do benzonidazol.

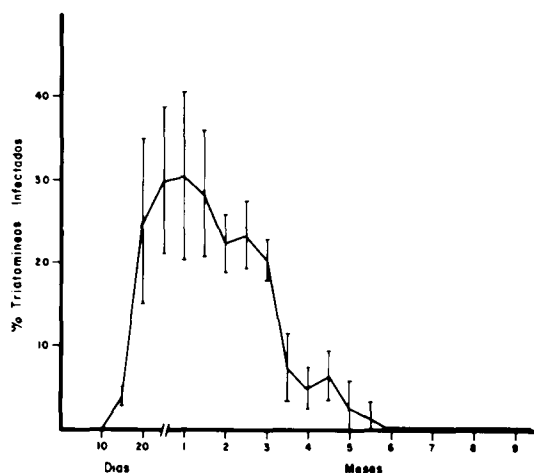


Fig. 2 – Níveis de parasitemias demonstrados em coelhos inoculados com tripomastigotas da cepa Ernestina do *Trypanosoma cruzi*. O percentual de parasitemia foi obtido pelo número de *Dipetologaster maximus* que se infectou após o repasto/número desses triatomíneos no xenodiagnóstico x 100.

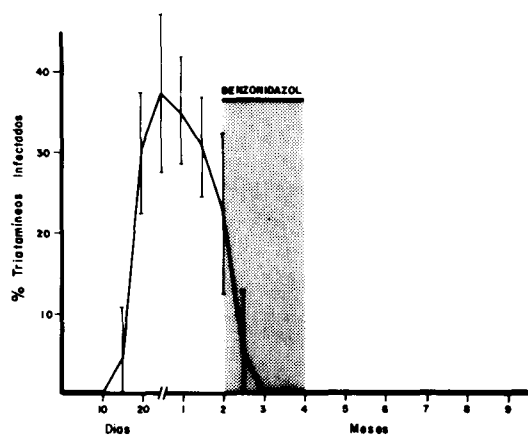


Fig. 3 – Níveis de parasitemias demonstrados em coelhos inoculados com tripomastigotas da cepa Ernestina do *Trypanosoma cruzi*, e tratados com benzonidazol após 2 meses de infecção. A duração da parasitemia foi abreviada, pois todos os animais apresentam xenos negativos após 30 dias de tratamento.

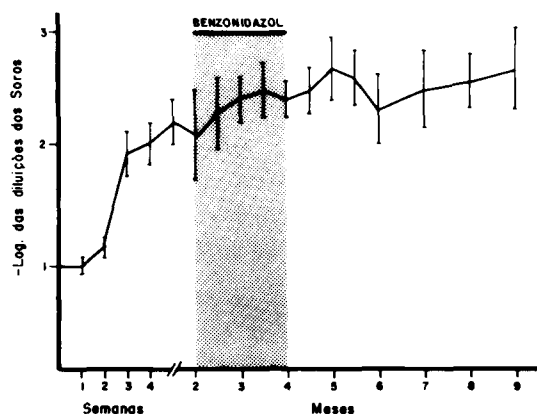


Fig. 4 – Níveis de anticorpos séricos, detectados pelo teste de aglutinação direta de *T. cruzi*, em coelhos tratados com benzonidazol a partir do segundo mês de infecção pelo *T. cruzi*. Note que os títulos desses anticorpos não foram modificados pela quimioterapia.

de vista sorológico, parece impossível distinguir, com a técnica empregada neste trabalho, os coelhos chagásicos tratados dos outros coelhos chagásicos que não receberam a droga. Sendo assim, não há qualquer dado sugestivo de que o tratamento teria sido benéfico, pois os títulos elevados dos anticorpos séricos são indicativos de persistência da estimulação antigênica específica.

Também, foi interessante notar que coelhos chagásicos e coelhos normais, imunizados com estroma de hemácias de carneiro durante o tratamento com benzonidazol, produziram títulos de anticorpos hemolíticos semelhantes àqueles obtidos após a imunização dos coelhos chagásicos e não-chagásicos que não foram submetidos à ação da droga. Em resumo, o tratamento com benzonidazol não alterou a resposta imunitária humoral induzida pelo *T. cruzi*, da mesma forma que não modificou a produção de anticorpos contra hemácias de carneiro.

Se, por um lado, a imunidade humoral não foi alterada pela ação da droga, por outro lado, a resposta imunitária celular foi completamente suprimida pelo benzonidazol. Os animais chagásicos tratados com este composto, na fase aguda ou na fase crônica da infecção, deixaram de reagir contra antígeno do *T. cruzi* injetado por via intradérmica, enquanto que os coelhos chagásicos não tratados apresentaram reação cutânea de hipersensibilidade tardia de grande intensidade, 48hs após a injeção do antígeno. A supressão *in vivo* da resposta imunitária celular específica, obtida neste estudo pelo uso do benzonidazol, está de acordo com os resultados de Lelchuck e cols.²³, que observaram alteração da imunidade celular *in vitro*, indicada pela ausência de inibição da migração de leucócitos de pacientes chagásicos tratados com nifurtimox, por antígeno do *T. cruzi*. Em nosso experimento, a supressão das reações de imunidade celular, em coelhos tratados com benzonidazol, foi observada sempre durante a quimioterapia, e sua reversão para níveis normais ocorreu logo após a suspensão da droga. No estudo de Lelchuck e cols.²³ a alteração da imunidade celular, nos pacientes chagásicos tratados com nifurtimox, persistia por dois anos após o tratamento.

A supressão temporária das reações de imunidade celular poderia ser uma indicação de que houvera diminuição da estimulação antigênica, devido ao efeito tripanocida da droga. Entretanto, há também a possibilidade de que a

supressão tenha sido devida a um efeito citotóxico do benzonidazol sobre as células do sistema imune timo-dependente. Esta hipótese foi estudada em outros experimentos que permitiram verificar o efeito tóxico inespecífico da droga sobre as reações imunocelulares, em animais imunizados com BCG ou sensibilizados com DNCB. Estes experimentos mostraram que as reações de hipersensibilidade tardia contra os antígenos específicos, nestes animais, também foram suprimidas pelo tratamento. Isto indica que a supressão das reações de imunidade celular ocorre indistintamente em coelhos imunizados com BCG, sensibilizados com DNCB ou infectados com *T. cruzi*. Estes resultados também são comparáveis àqueles obtidos por Lelchuck e cols.²⁴ que verificaram a supressão *in vivo e in vitro* da resposta imune específica mediada por células, em cobaias imunizados com adjuvante completo de Freund e testadas com PPD, durante o tratamento com nifurtimox. Os níveis de imunidade voltaram aos valores normais após o tratamento²⁴. Os resultados dos nossos experimentos com benzonidazol, assim como os resultados de Lelchuck e cols.^{23, 24} com nifurtimox, indicam que esses compostos nitro-aromáticos devem alterar profundamente as respostas imunes celulares devido à citotoxicidade que afeta principalmente as células timo-dependentes.

Os mecanismos de citotoxicidade induzidos pelos compostos nitro-aromáticos exercem seus efeitos tanto sobre os microrganismos patogênicos como sobre as células de mamíferos²². A condição essencial à ação citotóxica de todos nitro-aromáticos é a presença de sistema enzimático na célula alvo capaz de proceder à redução enzimática do nitro-grupo, que é o sítio ativo da molécula presente em todos os compostos desta família²⁸. Parece até mesmo ironia da natureza o fato de que somente as células capazes de metabolizar as substâncias nitro-aromáticas sejam capazes de sofrer o efeito tóxico e morrer ou se alterar em consequência disto²¹. Por exemplo, os mecanismos de toxicidade do nifurtimox sobre diferentes formas do *T. cruzi*¹⁶ foi também descrito para as células de mamíferos¹⁵. Estes mecanismos geram radicais livres, que através de outras vias não enzimáticas formam metabólitos intermediários, como o O_2^- , H_2O_2 , OH^- e o próprio nitroanion radical que é reciclado ao ponto inicial após uma série de reações eletroquímicas^{15 16 22}. Os metabólitos intermediários são tóxicos e alteram a estrutura e função de macromo-

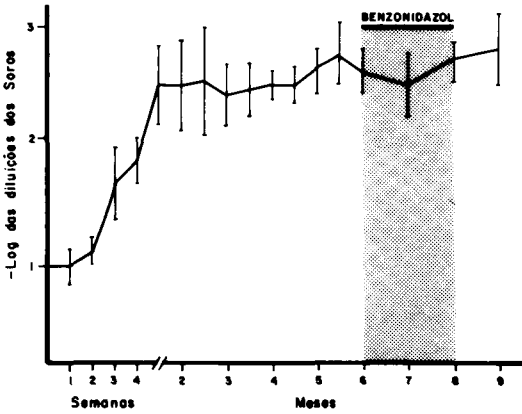


Fig. 5 - Níveis de anticorpos séricos em coelhos tratados com benzonidazol na fase crônica da infecção chagásica. A quimioterapia não produziu queda dos títulos de anticorpos capazes de aglutinar diretamente o *T. cruzi*.

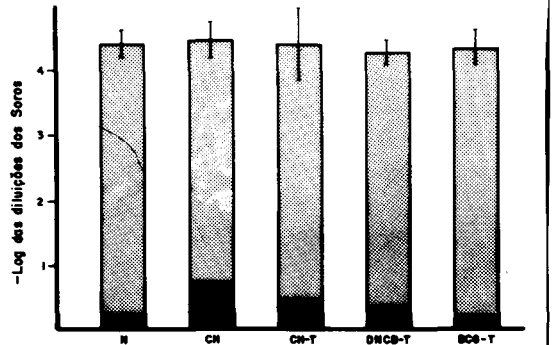


Fig. 6 - Produção de anticorpos hemolíticos em coelhos imunizados com estroma de hemácias de carneiro durante o tratamento com benzonidazol. C, controle normais; CH, chagásicos; CH-T, chagásicos em tratamento; DNCB-T, sensibilizados com DNCB e submetidos ao tratamento; BCG-T, imunizados com BCG e submetidos ao tratamento. ■ = anticorpos heterófilos prévios à imunização; □ = anticorpos hemolíticos após imunização. Note que todos os grupos de animais responderam à imunização com títulos similares de anticorpos hemolíticos.

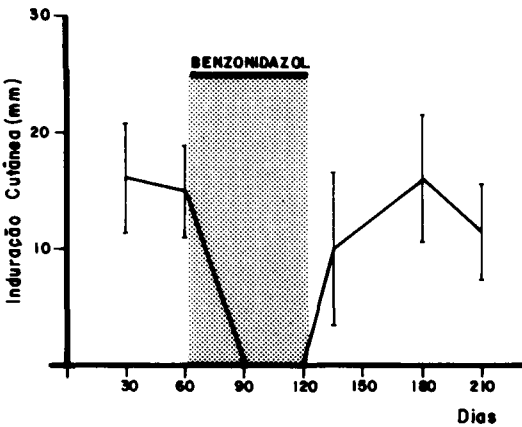


Fig. 7 - Efeito do benzonidazol nas reações cutâneas de hipersensibilidade tardia de coelhos chagásicos testados com antígeno subcelular de *Trypanosoma cruzi*. A quimioterapia resultou na supressão das reações de hipersensibilidade, que voltaram a ficar positivas somente após o tratamento.

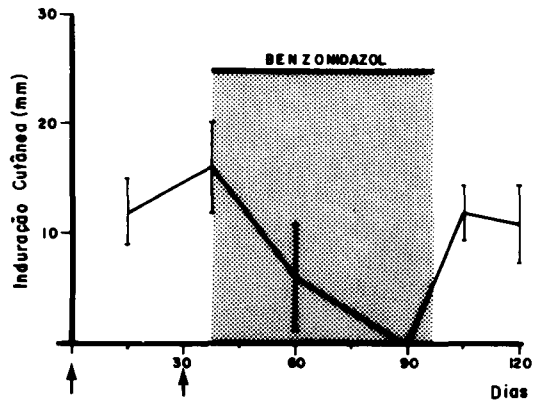


Fig. 8 - Efeito do benzonidazol nas reações cutâneas de hipersensibilidade tardia em coelhos imunizados com BCG e testados com PPD. As setas mostram as épocas da administração intramuscular de 0,5ml de BCG. Observe que a quimioterapia também alterou as reações cutâneas, suprimindo-as finalmente. Porém, as reações voltaram a ficar positivas após o tratamento.

lécúlas, alcalinizam protefínas e ácidos nucléicos, e participam da peroxidação de lipídios. Estas reações seriam responsáveis pelo efeito letal sobre o *T. cruzi* ou sobre outros microorganismos e células de mamíferos. A redução do nitro-grupo também pode levar à formação de hidroxilamina, metabólito que tem sido considerado como responsável pelos efeitos tóxicos de vários compostos nitro-aromáticos^{2 21 47}.

Em decorrência do desarranjo que produz nas moléculas, os nitro-aromáticos modificam intensamente o metabolismo celular. Por exemplo, há indicações de que o efeito tóxico do benzonidazol, assim como de outros derivados nitro-imidazólicos, está relacionado ao seu potencial de redução²². Desta forma, sua ação tóxica resulta em alteração da respiração aeróbica do *T. cruzi* e inibição drástica da síntese de protefínas, de RNA e DNA celular, podendo ser letal³⁴. Desgraçadamente, estes efeitos se verificam também sobre o hospedeiro mamífero, com tendência a atingir mais gravemente as células sujeitas à multiplicação. Por isto mesmo, são mais atingidos por seus efeitos

colaterais o ser em desenvolvimento, as células da linhagem reprodutiva e as células do adulto que mantêm a capacidade de multiplicação. Assim, alguns ensaios que visam a estudar os efeitos tóxicos de compostos nitro-aromáticos *in vitro* usam células da linhagem linfóide². Ademais, outros efeitos colaterais graves como esterilidade, mutagenicidade, teratogenicidade, radiomimetismo e cancerogenicidade tem sido descritos após o uso de vários compostos desta família^{11, 20, 29, 38}.

Não obstante todas as alterações produzidas no metabolismo, com conseqüências diretas sobre a imunidade celular, o uso do benzonidazol poderia ser benéfico se resultasse na erradicação do *T. cruzi*. Ao invés disto, o que se tem verificado no nosso laboratório é o aparecimento de neoplasias malignas em vários coelhos chagásicos tratados com esta droga em doses terapêuticas. (ARL Teixeira, E Jabur, JC Córdoba, IC Souto Maior, E Solórzano: dados não publicados).

SUMMARY

Rabbits inoculated with trypomastigotes of the Ernestina strain of Trypanosoma cruzi showed parasitemias, which were demonstrated by xenodiagnosis during five and half months of the infection. The administration of 8mg/kg/day for 2 months of benznidazole in rabbits with two months infection resulted in persistently negative xenodiagnoses after 30 days of chemotherapy. Also rabbits with chronic Chagas' disease showing negative parasitemia six months after infection were treated with benznidazole. Both groups of rabbits that received intraperitoneal injections of the drug had titers of serum antibodies to the parasite similar to those shown in untreated T. cruzi-infected rabbits. That the humoral antibody response is not altered by the benznidazole was demonstrated in other experiments, which showed that the animals under chemotherapy can produce hemolytic antibody titers as high as those found in controls as well as in T. cruzi-infected untreated rabbits.

In marked contrast, the thymus-dependent immune function was severely affected by benznidazole. The delayed-type hypersensitivity reaction against a T. cruzi subcellular antigen was suppressed during chemotherapy, whereas the reaction was consistently present in untreated T. cruzi-infected rabbits. However, delayed-type hypersensitivity against the parasite antigen could be elicited 10 days after cessation of treatment. Also delayed hypersensitivity in rabbits immunised with BCG and tested using PPD or in rabbits sensitised to DNCB were also suppressed by benznidazole treatment.

It has been shown therefore that both drugs used for treating Chagas' disease can produce profound alterations in the thymus-dependent immune response. Benznidazole and nifurtimox are nitro-aromatic compounds that undergo enzymatic reduction with production of intermediate metabolites that can be strongly cytotoxic for the T. cruzi and for the mammalian cells.

(Key-Words: Benznidazole. Immunosuppression. Cell-mediated immune response. T lymphocytes. Chagas' disease. Trypanosoma cruzi. Rabbits).

AGRADECIMENTOS

A assistência técnica de Maria José Gonçalves, Glória Martins e Luzia Machado da Silva foi valiosa para a realização deste trabalho.

Tabela 1 — Efeito do benzonidazol sobre as reações de hipersensibilidade de contato induzidas pelo DNCB*.

Coelhos	Pré-tratamento	Tratamento	Pós-tratamento
1	+	—	++
2	++	—	+
3	+	—	—
4	++	—	++
5	+++	±	++
6	+	±	+

* Os coelhos foram sensibilizados na face interna da orelha com 50µl de uma solução contendo 10mg% (p/v) de DNCB em acetona, com 30 dias de intervalo entre o 1º e o 2º contato com a droga. Em seguida os animais foram desafiados pela exposição a uma dose de DNCB 100 vezes inferior àquela usada para a sensibilização, na face interna da orelha contra-lateral.

+ = eritema; ++ = eritema e pápula; +++ = eritema, pápula e crosta.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Bock M, Gonnert R, Haberkorn A. Studies with BAY 2502 on animals. *Boletín Chileno de Parasitología* 24:13-19, 1969.
- Boyd MR, Stiko AW, Sasame HA. metabolic activity of nitrofurantoin. Possible implication for carcinogenesis. *Biochemical Pharmacology* 28:601-606, 1979.
- Brener Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldefdosemicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 3:43-49, 1961.
- Brener Z. Atividade terapêutica da furaldone, furazolidone e furadantina na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *O Hospital* 60:205-209, 1961.
- Cançado JR. Aspectos clínicos da padronização dos métodos para avaliação dos efeitos da doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina* 9:217-232, 1973.
- Cançado JR, Marra MD, Lopez M Mourão O, Faria CAF, Alvares JM, Salgado AA. Toxicidad y valor terapeutico del Bay 2502 en la enfermedad de Chagas cronica en tres esquemas posológicos. *Boletín Chileno de Parasitología* 24:28-32, 1969.
- Cançado JR, Salgado A, Batista SM. Chiari C. Segundo ensaio terapêutico com o nifurtimox na doença de Chagas. *Revista Goiana de Medicina* 22:203-233, 1976.
- Cerisola JA. Evolución serológica de pacientes con enfermedad de Chagas aguda tratados con Bay 2502. *Boletín Chileno de Parasitología* 24:54-59, 1969.
- Cerisola JA, Rabinovitch A, Alvarez M, Corleto CA, Prumeda J. Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangue. *Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana* 73: 203-221, 1972.
- Cerisola JA, Rohwedder R, Segura EL, Del Pardo CE, Alvarez M, Martini GJW. El xenodiagnóstico. Normalización. Utilidad. Editora I.N.I.C., Buenos Aires, 1974.
- Cohen SM, Ertürk E, Cronetti AJ, Bryan GT. Carcinogenicity of 5-nitrofurans, 5-nitroimidazoles, 4-nitrobenzenes and related compounds. *Journal National Cancer Institute* 51:403-417, 1973.
- Cossio P, Damilano G, Vega MT, Laguens RP, Cabeza Meckert. P, Diez C, Arana R. In vitro interaction between lymphocytes of chagasic individuals and heart tissue. *Medicina (Buenos Aires)* 36:287-293, 1976.
- Cossio P, Laguens RP, Kreutzer R, Diez C, Arana RM. Chagas' cardiopathy: immuno-

- pathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *American Journal of Pathology* 86:533-544, 1977.
14. Coura JR. Perspectivas e implicações da terapêutica específica. In: Anais do Congresso Internacional sobre Doenças de Chagas, Rio de Janeiro, p 8-12, 1979.
 15. Docampo R, Mason RP, Mottley C, Muniz RFA. Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian tissues. *Journal of Biological Chemistry* 256:930-933, 1981.
 16. Docampo R, Moreno SJN, Stoppani AON, Leon WC, Villata F, Muniz RFA. Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Pharmacology* 30:1947-1951, 1981.
 17. Dodd MC. The chemotherapeutic properties of 5-nitro-2-furaldehyde semicarbazone (Furacin). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 86:311-323, 1946.
 18. Dodd MC, Stillman WB. The in vitro bacteriostatic action of some simple furan derivatives. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 82:11-18, 1944.
 19. Grunberg E, Beskid G, Cleeland R, Delorenzo WF, Titsworth E, Scholer HJ, Richle R, Brener Z. Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 513-519, 1968.
 20. Headley DB, Klopp RG, Michie PM, Ertürk E, Bryan GT. Temporal comparison of immune status and target organ histology in mice fed carcinogenic 5-nitrofurans and their nor-nitro analogs. *Cancer Research* 41:1397-1401, 1981.
 21. Heidelberg C. Chemical carcinogenesis. *Cancer* 40:430-433, 1977.
 22. Knox RJ, Knight RC, Edwards DI. Interaction of nitroimidazole drugs with DNA in vitro: structure-activity relationships. *British Journal of Cancer* 44:741-745, 1981.
 23. Lelchuck R, Cardoni RL, Fuks AS. Cell-mediated immunity in Chagas' disease. Alterations induced by treatment with a trypanocidal drug (nifurtimox). *Clinical and Experimental Immunology* 30:434-438, 1977.
 24. Lelchuck R, Cardoni RL, Lewis S. Nifurtimox-induced alterations in the cell-mediated immune response to PPD in guinea pigs. *Clinical and Experimental Immunology* 30:469-473, 1977.
 25. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr LA, Randall RJ. Protein measurements with the folin reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193:265-267, 1951.
 26. Manso Soto AE, Lopetegui R. Derivados del furano como tripanosomicidas. Acción del 5-nitrofurfural-diacético, en la infección experimental en Laucha, con *Trypanosoma cruzi*. Univ. Buenos Aires, Mission de Estudios de la Patología Regional Argentina 23:43-45, 1951.
 27. Mayer MM. Complement and complement fixation. In: Kabat EA, Mayer MM (ed) *Experimental Immunochemistry*. 2a. edição. Charles C Thomas, Illinois, p 133-240, 1971.
 28. McCalla DR, Voutsino D. On the mutagenicity of nitrofurans. *Mutation Research* 26:3-16, 1974.
 29. Morris JE, Price JM, Lulich JJ, Stein RJ. The carcinogenicity activity of some 5-nitrofurans derivatives in the rat. *Cancer Research* 29:2145-2156, 1969.
 30. Neva F, Gam A. A complement-fixing antigen from *Trypanosoma cruzi* grown in cell culture. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 26:37-46, 1977.
 31. Packchianian A. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofurans compounds. *Journal of Parasitology* 38:30, 1952.
 32. Packchianian A. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofurans compounds. *Antibiotics and Chemotherapy* 11:13-23, 1957.

33. Pizzi T. Un derivado imidazólico efectivo en el tratamiento de las infecciones experimentales por *Trypanosoma cruzi*. Boletín Chileno de Parasitología 16:35-36, 1961.
34. Polak A, Rickle R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 72:45-54, 1978.
35. Rassi A. Atualização terapêutica da doença de Chagas e critério de avaliação de cura. Jornal Brasileiro de Medicina 10:529-533, 1966.
36. Santos-Buch CA, Teixeira ARL. The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. Journal of Experimental Medicine 148:38-53, 1974.
37. Schenone H, Concha L, Aranda R, Rojas A, Knierim F, Rojo M. Tratamiento de la infección crónica humana: experiencia en Chile. In: Simposio Internacional sobre Enfermedad de Chagas, Sociedade Argentina de Parasitología, Buenos Aires, p 287-291, 1972.
38. Stein RJ, Yost D, Petrolunas F. Carcinogenic activity of nitrofurans. A histologic evaluation. Federation Proceedings 25:291, 1966.
39. Tafuri WL, Lima Pereira FE, Bogliolo L, Raso P. Lesões do sistema nervoso autônomo e do tecido muscular estriado esquelético na fase crônica da tripanosomíase cruzi experimental. Estudos ao microscópio ótico e eletrônico. Revista Goiana de Medicina 26:61-67, 1979.
40. Teixeira ARL. Competência imunológica do paciente chagásico. Imunodepressão na forma aguda inaparente. Autoimunidade no hospedeiro imunizado. Tese de doutorado, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1981.
41. Teixeira ARL, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. Journal of Immunology 113:859-869, 1974.
42. Teixeira ARL, Santos-Buch CA. The immunology of Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. Immunology 28:401-410, 1975.
43. Teixeira ARL, Teixeira ML, Santos-Buch CA. The immunology of Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. American Journal of Pathology 80:163-178, 1975.
44. Teixeira ARL, Teixeira G, Macêdo VO, Prata A. *Trypanosoma cruzi* - sensitized T-lymphocytes mediated ⁵¹Cr release from human heart cells in Chagas' disease. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 27:1097-1107, 1978.
45. Teixeira ARL, Solórzano E, Zappalá M, Junqueira Jr LF. Doença de Chagas experimental em coelhos isogênicos III/J. Fisiopatologia das arritmias e da morte súbita do chagásico. Revista da Associação Médica Brasileira (em publicação).
46. Teixeira ML, Rezende Filho J, Figueiredo F, Teixeira ARL. Chagas' disease: selective affinity and cytotoxicity of *Trypanosoma cruzi* - immune lymphocytes to parasymphathetic ganglion cells. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 75:33-45, 1980.
47. Varnes ME, Biaglow JE. Inhibition of glycolysis of mammalian cells by misonidazole and other radiosensitizing drugs. Prevention by thiols. Biochemical Pharmacology 31:2345-2351, 1982.
48. Vattuone NH, Yanovsky JF. *Trypanosoma cruzi*: agglutination activity of enzyme treated epimastigotes. Experimental Parasitology 30:349-355, 1971.