

## EFECTOS BENEFICIOSOS DEL BENZNIDAZOL EN UN CUADRO DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA DE BASE INFECCIOSA: LIGACIÓN Y PUNCIÓN CECAL

ROMINA MANARIN,<sup>(1, 2)\*</sup> EMANUEL BOTTASSO,<sup>(1)</sup> OSCAR BOTTASSO,<sup>(1)</sup> ESTEBAN SERRA,<sup>(2)</sup> SILVIA REVELLI.<sup>(1)</sup>

1) Instituto de Inmunología. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Rosario;

2) Instituto de Biología Molecular y Celular de Rosario-CONICET. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, UNR.

### Resumen

Nuestro grupo probó que el tratamiento con benznidazol (BZL), antiparasitario empleado para tratar la enfermedad de Chagas, protege a ratones desafiados con lipopolisacárido, aumentando su supervivencia y disminuyendo los niveles séricos de citoquinas proinflamatorias. Esto nos alentó a evaluar su acción en una situación más aproximada a la sepsis: el modelo de Ligación y Punción Cecal (CLP), el cual deviene en peritonitis séptica. El esquema de administración de BZL fue 2 h pre-CLP y cada 12 h post-CLP en ratones C57BL/6 y evaluamos diferentes dosis (200, 25 y 10 mg/kg de peso) por vía oral. Se realizaron grupos *sham* como controles quirúrgicos. Animales *sham* y con CLP recibieron BZL y vehículo (V). Se analizaron estado clínico, supervivencia, niveles circulantes de compuestos relacionados con la inflamación (NO, FNT- $\alpha$ ) y bacteriemia. Los tratados con BZL 25 mg/kg presentaron un aumento de la tasa de supervivencia 24 h post-CLP, mostrando una mejor condición clínica, así como una reducción significativa de los niveles de FNT- $\alpha$  y bacteriemia con respecto a los demás. El BZL no inhibió el crecimiento bacteriano. Por lo tanto, la mejoría observada en los animales CLP+BZL 25 se debería al menos a las propiedades inmunomoduladoras de la droga.

**Palabras clave:** shock séptico; benznidazol; inmunomoduladores

### BENEFICIAL EFFECTS OF BENZNIDAZOLE DURING AN INFECTIOUS-BASED SITUATION OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE: CECAL LIGATION AND PUNCTURE

#### Summary

We have demonstrated earlier that benznidazole (BZL), a drug employed to treat Chagas' disease, markedly reduced the production of proinflammatory cytokines and NO-derived metabolites in experimentally *T. cruzi*-infected rats. Treatment with BZL exerted beneficial effects in a model of inflammation-based pathology like murine experimental endotoxemia. Based on these findings we wished to ascertain the effect of BZL in a situation that more closely resembles sepsis, the Cecal Ligation and Puncture (CLP) model in C57BL/6 mice. We analyzed clinical course, survival, circulating levels of inflammation-related compounds (NO, TNF- $\alpha$ ) and bacteriemia. Recipients of BZL, 25 mg/kg, had an increased survival rate at 24 h post-CLP, showing a better clinical situation as well as a significant reduction of TNF- $\alpha$  levels and bacteriemia, compared to the other groups. BZL failed to inhibit *in vitro* bacterial growth, suggesting that present effects may be partly due to immunomodulatory effects of BZL.

**Key words:** Septic shock; benznidazole; immunomodulators

\* Correo electrónico: manarin@ibr.gov.ar

## INTRODUCCIÓN

Cuando un microorganismo ha logrado atravesar las barreras y penetrado en los tejidos o ganado la circulación, las células de la inmunidad innata se activan y secretan mediadores que promueven la generación de la respuesta inflamatoria. Entre otras características, la inflamación conduce a la atracción de leucocitos (neutrófilos y monocitos) y a la extravasación de varias proteínas plasmáticas en la zona de infección. La activación de estos leucocitos y proteínas en el sitio que rodea a la infección tiende a eliminar al agente infeccioso. La inmunidad innata puede generar una inflamación que beneficie al huésped y a la vez posibilitar la respuesta adaptativa que lleva a la erradicación del agente extraño. También pueden ocurrir respuestas innatas muy intensas, capaces de potenciar la destrucción de las bacterias pero al mismo tiempo provocar cambios patológicos en el huésped.<sup>1,2</sup>

Normalmente el sistema inmune y el neuroendocrino procuran controlar los procesos inflamatorios locales. Sin embargo, ya sea porque la infección local no logra resolverse o porque se produce una falla en los mecanismos reguladores, algunos individuos desarrollan una inflamación sistémica y el cuadro inicial termina transformándose en sepsis, sepsis severa o shock séptico.<sup>3</sup> El desarrollo del shock séptico es de causa multifactorial, puesto que el daño que ocurre en los tejidos y en los órganos, no sólo se debe a los microorganismos sino también a los mediadores liberados en respuesta a la infección.

Frente a una noxa, se desencadena la liberación de una compleja red de mediadores destinados a transmitir las señales que les permitirán a las células llevar a cabo el proceso inflamatorio. Entre los mediadores se destacan el factor de necrosis tumoral-alfa (FNT- $\alpha$ ) y el óxido nítrico (NO).

El FNT, junto con la IL-1, son los principales mediadores pro-inflamatorios en el shock séptico. El FNT es una citoquina que interviene en numerosos procesos fisiológicos y patológicos, entre los que se incluyen: 1) proliferación de células T, células B y fibroblastos; 2) inducción de otras citoquinas; 3) necrosis tumoral y 4) respuesta inflamatoria. Se han descrito dos tipos de moléculas relacionadas de FNT: el FNT- $\alpha$  o caquectina, y el FNT- $\beta$  o linfotoxina.<sup>4</sup> El FNT- $\alpha$  es producido y expresado por una amplia variedad de células, principalmente por los monocitos-macrófagos activados.<sup>5</sup> La producción de FNT- $\alpha$  puede ser inhibida por varias citoquinas tales como IL-4, IL-10 e interferón alfa y beta (IFN- $\alpha$  y  $\beta$ ). Las acciones del FNT- $\alpha$

están mediadas al menos por dos receptores de superficie funcionalmente diferentes, aunque estructuralmente relacionados: el FNT-RI (p55-60) y el FNT-RII (p75-80). El FNT-RI es expresado constitutivamente en casi todas las células del organismo (una excepción a ello son los linfocitos T no estimulados) en un nivel relativamente bajo (100-1.000 moléculas por célula), mientras que el FNT-RII se encuentra preferentemente en células linfoides y endoteliales.<sup>6</sup> Hoy se acepta ampliamente que la mayoría de las respuestas clásicas atribuidas al FNT- $\alpha$  son mediadas a través del FNT-RI: apoptosis, actividad antiviral y producción de citoquinas.<sup>7</sup>

Los macrófagos disponen de una serie de mecanismos efectores para intentar eliminar al microorganismo. Uno de estos mecanismos es la producción de NO. El NO es un mediador pleiotrópico que cumple diversas funciones biológicas, entre las cuales puede mencionarse vasodilatación, inhibición de la agregación plaquetaria, neurotransmisión, modulación de la actividad cardíaca y de la respuesta inmune. Es sabido que a nivel de los macrófagos la producción de NO está a cargo de una sintasa inducible de NO (NOSi), la cual es regulada transcripcionalmente por el IFN- $\gamma$  solo o en forma sinérgica con el FNT- $\alpha$ <sup>8</sup> y su acción está vinculada a la destrucción de patógenos con hábitat intracelular. Su sobreproducción tiene consecuencias tóxicas para diversos órganos y sistemas y ha sido relacionada con el desarrollo de varios eventos patológicos, entre los cuales está incluido el shock séptico.

Como mencionamos, durante procesos de naturaleza infecciosa el individuo reacciona con una respuesta defensiva generalizada habitualmente denominada respuesta de fase aguda, la cual se caracteriza por un gran componente inflamatorio que al tornarse excesivo o prolongado deja de ser protector para dañar al huésped. Ejemplos típicos de esta situación pueden obtenerse a través de estudios experimentales como el de endotoxemia experimental donde el desafío con lipopolisacárido (LPS) provoca un cuadro de respuesta inflamatoria sistémica letal, en el término de pocos días. Con el propósito de aminorar esta respuesta y de ese modo lograr un cierto grado de protección, se están llevando a cabo un número variado de estrategias inmunofarmacológicas. Dentro de este contexto, nuestro grupo de trabajo decidió explorar la utilidad del BZL –antiparasitario empleado para el tratamiento de la enfermedad de Chagas– en modelos con componente inflamatorio.

Hace ya algunos años describimos por primera vez que el BZL posee, además de su conocida actividad anti-parasitaria, actividad inmunomoduladora. La pri-

mera evidencia se observó en un ensayo experimental de terapia combinada de dosis sub-óptimas de BZL e IFN- $\gamma$ , en un modelo de infección con *T. cruzi* en ratas, donde el agregado de BZL descendía los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias y de NO.<sup>9</sup> Recientemente, describimos que esta droga también era capaz de inhibir la producción de NO y citoquinas pro-inflamatorias en la línea de macrófagos murinos RAW 264.7, a través de la inhibición de la activación de NF- $\kappa$ B.<sup>10-12</sup>

**Esta nueva actividad del BZL, sumada a su extensa historia de uso clínico, lo convierte en un buen candidato para incorporar al arsenal terapéutico en patologías de origen inflamatorio para las cuales no se cuenta con un tratamiento eficaz.**

En nuestro laboratorio se evaluó el efecto del BZL sobre la progresión y la producción de mediadores pro y anti-inflamatorios en un modelo de endotoxemia experimental en ratones C57BL/6. Los ratones se trataron con 200 mg/kg de BZL por vía oral y fueron desafiados con LPS por vía intraperitoneal. El tratamiento con BZL otorgó protección a los animales desafiados con LPS, aumentando su supervivencia en forma significativa. Además, disminuyó los niveles séricos de citoquinas pro-inflamatorias, inhibió la producción de IL-6 por los macrófagos peritoneales y la expresión de los ARNm hepáticos para IL-12 y NOSi.<sup>12</sup>

Estos resultados nos alentaron a probar el BZL en el modelo de CLP. Este modelo causa peritonitis séptica y posterior estado de shock. Pese a las limitaciones propias de los modelos experimentales, el modelo murino de CLP semeja más al cuadro séptico humano que el modelo de endotoxemia experimental con respecto al patrón de citoquinas y quimioquinas generadas y al desarrollo de una falla multiorgánica fulminante.<sup>13</sup>

## OBJETIVOS

Probar si el BZL consigue modificar el curso del cuadro séptico experimental en el modelo de CLP.

Para ello se analizará la supervivencia, aspecto clínico, algunos mediadores importantes en el desarrollo de la respuesta inflamatoria (NO, FNT- $\alpha$ ) y bacteriemia en los animales con CLP y tratados con diferentes dosis de BZL.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1- Grupos experimentales

Para el desarrollo del modelo se utilizaron ratones machos de la cepa C57BL/6, de 8-10 semanas de edad, provenientes del Bioterio de la Facultad de Cs. Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Los animales fueron mantenidos en las condiciones de luz,

temperatura y alimentación de acuerdo a las normas internacionales para el cuidado de animales de laboratorio. Se conformaron los siguientes grupos, a saber: 1) Control (animal sin manipulación); 2) *sham* + V; 3) *sham* + BZL 10 mg/kg de peso; 4) *sham* + BZL 25 mg/kg de peso; 5) *sham* + BZL 200 mg/kg de peso; 6) CLP + V; 7) CLP + BZL 10 mg/kg de peso; 8) CLP + BZL 25 mg/kg de peso; 9) CLP + BZL 200 mg/kg de peso.

### 2- Modelo de Ligación y Punción Cecal

La CLP se realizó según lo descrito por Baker y col.<sup>14</sup> Después de la inducción de la anestesia, se abrió el abdomen, se extrajo y ligó el ciego, justo por debajo de la válvula ileocecal. Luego, se realizó una doble punción con aguja 21G permitiendo que el contenido cecal se disemine por la cavidad peritoneal, causando una peritonitis polimicrobiana. El ciego se reintegró a la cavidad peritoneal y la incisión se cerró en dos capas.

### 3- Evaluación del estado clínico y supervivencia de los animales

Para ello se tuvo en cuenta la movilidad de los animales, piloerección, secreción ocular, y signos de hiper o hipotermia.

### 4- Tratamiento con BZL

El BZL fue donado por Laboratorios Roche (Argentina y Brasil). Como vehículo (V) de resuspensión del BZL se utilizó carboximetilcelulosa (CMC) de Sigma-Aldrich (Argentina).

Los animales recibieron un tratamiento preventivo con BZL suspendido en CMC al 1% y administrado por vía oral, por medio de una cánula, en dosis de 200, 25 y 10 mg/kg de peso en un volumen de 0,1 ml. El esquema terapéutico que se aplicó para administrar la droga fue 2 h antes de la CLP y cada 12 h post-CLP. Los animales control recibieron una cantidad equivalente de CMC al 1%. El esquema preventivo se diseñó para permitir que la droga se absorba y alcance la concentración farmacológicamente activa a partir de su administración por vía oral. Se ensayaron las distintas concentraciones de BZL y cuando se estudiaba el efecto de la droga sobre la sobrevida de los animales, el grupo CLP + BZL 200 mg/kg de peso presentó el peor estado clínico. Por eso, para los estudios siguientes este grupo no fue utilizado.

### 5- Estudio de mediadores en suero

El NO en suero se midió como nitrato por el método de Griess<sup>15</sup> (volúmenes iguales de sulfanilamida 1% P/V en ácido acético al 30% y naftietilendiamina 0,1% P/V en ácido acético al 60%), el cual permite cuantificar directamente nitrito determinando su absor-

bancia a 540 nm. La lectura se realizó en un lector de placas de ELISA (*Microwell System Reader, Organon Teknika*). La determinación de nitrito total (nitrato reducido sumado al nitrito ya presente en la muestra) se realizó mediante la reducción enzimática del nitrato a nitrito, llevada a cabo por la actividad nitrato reductasa presente en las bacterias *Pseudomonas oleovorans* (cepa ATCC 8062). Alícuotas de 70 µl de los sobrenadantes (SN) fueron incubados con 70 µl de la suspensión de bacterias (diluidas 1/10 en medio mínimo M9) durante 90 min a 37°C y posteriormente centrifugados a 300 g durante 15 min. Se tomaron 100 µl del SN, a los cuales se los sometió al método de Griess. Idéntico tratamiento se realizó con una curva estándar de NaNO<sub>3</sub> (5 a 200 mM). Las distintas diluciones de la curva estándar se prepararon en medio mínimo M9 a partir de una solución madre de 100 mM. Los resultados obtenidos se expresaron en mM de nitrito.

El dosaje de FNT-α en suero se realizó mediante la técnica de ELISA, según las instrucciones del fabricante (*mouse TNF ELISA SET, BD OptEIA [BD Biosciences]*).

#### 6- Bacteriemia

La bacteriemia fue medida como UFC/ml 24 h post-cirugía. Se extrajo sangre de los animales con CLP tratados con las diferentes dosis de BZL en tubos estériles y las UFC/ml se determinaron a partir de diluciones seriadas. Luego, las diferentes diluciones se sembraron en placas agar Columbia-sangre y se incubaron durante 16 h a 37°C.

#### 7- Estudio de la actividad bactericida del BZL

Se extrajo el contenido cecal de los ratones, en esterilidad, y se sembró en placas de Petri conteniendo diferentes medios de cultivo: 1) agar chocolate, 2) agar sangre, 3) CLDE (cisteína-lactosa deficiente en electrolitos), 4) Salmonella-Shigella, de manera de tratar de contemplar todas las bacterias de la flora habitual del animal. Luego, se colocaron discos de 5 mm de diámetro embebidos con dimetilsulfóxido (DMSO) y con BZL en DMSO. Se probaron concentraciones de BZL que *in vitro* poseen efecto inmunomodulador (0.1, 1 mM) y también 10 mM. Las placas de Petri sembradas se incubaron a 37°C durante toda la noche tanto en condiciones aeróbicas como en jarra de anaerobiosis. Después de la incubación se evaluó la presencia de halo de inhibición.

#### 8- Análisis estadístico

Todos los resultados mostrados corresponden a dos vueltas experimentales con resultados similares.

Para comparar la proporción de animales vivos en

los distintos grupos se utilizó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher para tablas (2xk). Los datos obtenidos de NO y bacteriemia se estudiaron con el análisis de la variancia de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis, y con la prueba *U* de Mann-Whitney. La variable FNT-α se analizó por el método de ANOVA unidireccional seguido de la prueba de múltiples comparaciones de Tukey. Las diferencias fueron consideradas significativas si  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

### 1. Estudio del efecto del BZL en un modelo de peritonitis séptica experimental

Como se describió más arriba, utilizamos el modelo de CLP, el cual provoca una sepsis polimicrobiana abdominal. Se realizaron los correspondientes grupos *sham* como controles quirúrgicos. Los animales *sham* y con CLP recibieron BZL por vía oral. Simultáneamente, otros grupos similares recibieron V. El esquema terapéutico de administración de BZL utilizado fue 2 h antes de la CLP y cada 12 h post-CLP como se detalla en Materiales y Métodos. Ensayamos diferentes concentraciones de BZL de manera de encontrar cuál de ellas estaría actuando como inmunomoduladora en nuestro modelo.

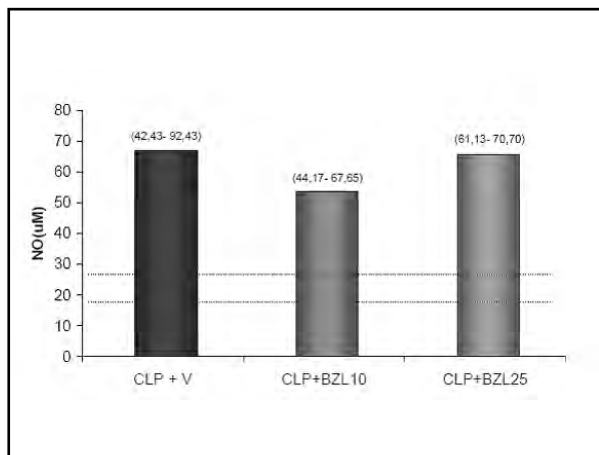
#### 1.1. Efecto de la administración de BZL sobre la sobrevivencia de ratones con CLP

En la Tabla I se puede apreciar la supervivencia de los distintos grupos experimentales.

Si bien al final del experimento (96 h post-CLP) no se evidenciaron diferencias en términos de supervivencia, entre los animales tratados con BZL y aquellos que recibieron sólo V –lo cual era de esperar en virtud de la letalidad del modelo de CLP– se evidencia una diferencia significativa a las 24 h post-CLP en cuanto al porcentaje de supervivencia entre el grupo tratado con BZL 25 mg/kg de peso y los demás grupos ( $p \leq 0,05$ ). Esto se relaciona con la mejor condición clínicamente observable de las 24 h en los ratones que recibieron BZL 25 mg/kg de peso con respecto a la de todos los grupos. Como el grupo de animales CLP + BZL 200 mg/kg de peso presentó signos de mayor empeoramiento clínico, para los estudios siguientes este grupo no fue utilizado.

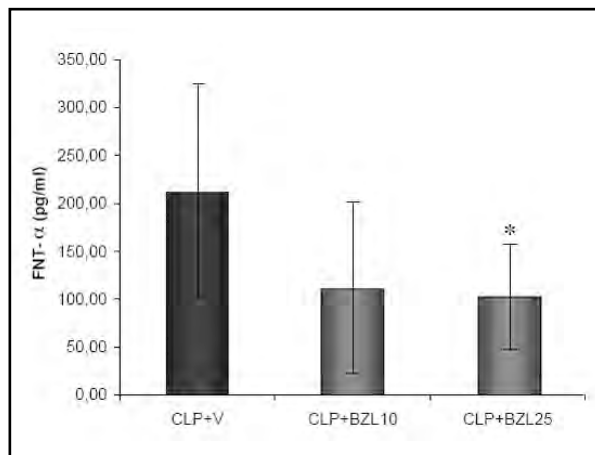
#### 1.2. Efecto de la administración de BZL sobre la producción de mediadores en suero y sobre la bacteriemia de ratones con CLP

Por lo expuesto, se decidió trabajar con dosis de BZL de 10 y 25 mg/kg, administradas 2 h antes de la cirugía y cada 12 h después de la misma. Luego, se pro-



**Figura 1. Concentración de NO en suero 24 h post-CLP.**

El NO en suero se midió como nitrato por el método de Griess. Podemos advertir que existe un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) en la producción de NO en todos los grupos con CLP con respecto a los controles sham (16-29 mM). Los niveles basales están representados por líneas punteadas. Los datos representan la media de los datos  $\pm$  ds,  $n = 3-5$ . Se muestra una ronda experimental de dos con resultados similares. Los mismos fueron analizados estadísticamente por medio del test de análisis de la variancia de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis y la prueba  $U$  de Mann-Whitney.



**Figura 2. Concentración de FNT- $\alpha$  en suero de ratones 24 h post-CLP.**

El dosaje de FNT- $\alpha$  en suero se realizó mediante la técnica de ELISA, según las instrucciones del fabricante ("mouse TNF ELISA SET, BD OptEIA" BD biosciences, San Diego, CA, USA). El análisis de los niveles séricos de FNT- $\alpha$  mostró que los ratones tratados con BZL 25 mg/kg de peso corporal presentan valores significativamente más bajos que los tratados con vehículo (CLP + V) ( $p = 0,04$ ). No se detectó el mediador en el suero de ratones controles *sham*. Se muestra una ronda experimental de dos con resultados similares. Los valores de FNT- $\alpha$  se expresan como la media de los datos  $\pm$  ds,  $n = 5-7$ . (\*) Diferencia estadísticamente significativa con el control, CLP+V. Test estadístico: análisis de la variancia ANOVA seguido del test de Tukey para las comparaciones múltiples.

cedió a la realización de la técnica quirúrgica y posterior extracción de muestras de sangre para la determinación de FNT- $\alpha$  y NO a diferentes tiempos post-CLP (90 min, 4 h y 24 h).

En primer lugar se evaluó la producción de NO. La Figura 1 muestra la concentración sérica de NO luego de 24 h de la cirugía en los diferentes grupos experimentales.

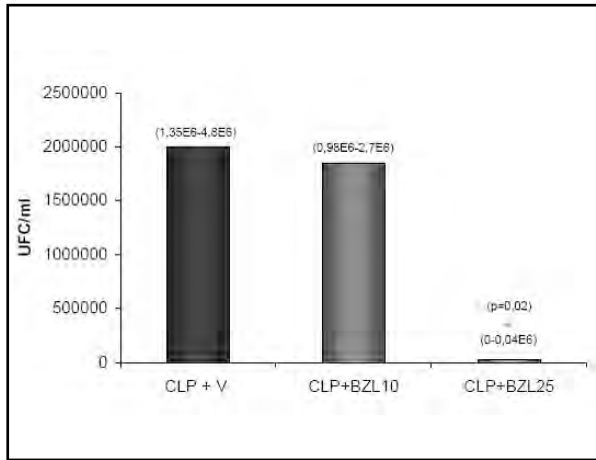
En la determinación de NO a los 90 min y 4 h post-CLP los niveles del mediador se ubicaron dentro de los valores basales (alrededor de 16-29  $\mu$ M) en todos los grupos. A las 24 h post-CLP, se observa un aumento significativo ( $p = 0,05$ ) en la producción de NO en todos los grupos con CLP con respecto a los controles *sham*.

Posteriormente, se estudiaron los niveles séricos de FNT- $\alpha$ . En la Figura 2 podemos observar un descenso significativo en los niveles de FNT- $\alpha$  en el grupo trata-

do con BZL 25 mg/kg de peso con respecto al grupo CLP + V ( $p = 0,04$ ).

En la determinación de los niveles séricos de FNT- $\alpha$ , el mismo no pudo ser detectado a los 90 min ni a las 4 h de realizada la intervención fuera cual fue el grupo analizado; tampoco se observó producción en los controles *sham* a las 24 h post-CLP.

Otro parámetro importante estudiado en este modelo fue la **bacteriemia**, medida como UFC/ml 24 h post-CLP. Se extrajeron muestras de sangre 24 h después de la cirugía, realizamos diluciones seriadas y sembramos en placas agar Columbia-sangre a 37°C durante 16 h. En la Figura 3 podemos ver que tanto los ratones sin manipulación como los controles *sham* no muestran bacteriemia. Los grupos CLP + V, CLP + BZL 10 mg/kg de peso muestran altos niveles de carga bacteriana y esto se correlaciona con el proceso séptico que están llevando a cabo. Algo llamativo es lo



**Figura 3. Bacteriemia 24 h post-CLP.** La bacteriemia fue medida como UFC/ml 24 h post-cirugía. Se extrajo sangre de los animales con CLP tratados con diferentes dosis de BZL en tubos estériles y las UFC/ml se determinaron a partir de diluciones seriadas que se sembraron en placas agar Columbia-sangre y se incubaron durante 16 hs a 37°C. Se muestra una ronda experimental de dos con resultados similares. Los valores de UFC/ml se expresan como la mediana de los datos (rangos); n= 3-5. (\*) Diferencia estadísticamente significativa con el control, CLP+V, p = 0,05. Test estadístico: análisis de la variancia de una clasificación por rangos de Kruskal-Wallis y la prueba U de Mann-Whitney.

que ocurrió con el grupo CLP tratado con BZL 25 mg/kg de peso; en este caso, la bacteriemia se encontró significativamente disminuida con respecto al grupo CLP + V.

*El BZL, en la dosis de 25 mg/kg de peso, estaría facilitando una mejor depuración bacteriana en los animales con CLP.*

**2. Estudio de la actividad bactericida del BZL**

Finalmente, nos preguntamos si esa disminución en la bacteriemia observada en el grupo CLP + BZL 25 mg/kg de peso, se debía a una facilitación de la depuración bacteriana por parte del BZL o que el fármaco estaba actuando directamente sobre las bacterias como bactericida. Por eso, decidimos evaluar si el BZL posee

**Tabla I.** Supervivencia de los animales a los distintos tiempos de observación. En la tabla se puede observar el número de ratones vivos sobre el total. La sobrevivida fue monitoreada durante 96 h. Comparaciones a las 24 h post-CLP muestran que los animales tratados con BZL 25 mg/kg de peso presentan el mayor porcentaje de sobrevivida respecto de los otros grupos (p= 0,05 entre los 4 grupos; p= 0,68 entre los grupos #, \* estadísticamente diferente de los otros grupos). Para comparar la proporción de animales vivos en los distintos grupos se utilizó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher para tablas (2xk).

Grupos	Horas transcurridas desde la cirugía				
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
CLP + V#	15/15 (100%)	8/15 (53,30%)	6/15 (40%)	2/15 (13,34%)	2/15 (13,34%)
CLP + BZL# 10 mg/kg	10/10 (100%)	4/10 (40%)	2/10 (20%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)
CLP + BZL* 25 mg/kg	10/10 (100%)	9/10 (90%) *	3/10 (30%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)
CLP + BZL# 200 mg/kg	9/9 (100%)	3/9 (33,40%)	2/9 (22,20%)	2/9 (22,20%)	2/9 (22,20%)

**Nota:** Siempre incluimos controles sham tratados con V y con BZL y su supervivencia fue del 100%. No se tuvieron en cuenta en el análisis de los resultados los animales que murieron durante la intervención quirúrgica por efectos adversos dosis-independientes a la anestesia, o por causas iatrogénicas (sección de vasos con hemorragia consecutiva y sección de vejiga durante la separación de los planos), que correspondieron al 16% de los mismos.

actividad bactericida. **En ninguno de los casos ensayados el BZL fue capaz de inhibir el crecimiento bacteriano.**

## DISCUSIÓN

A pesar del enorme esfuerzo invertido en comprender la fisiopatología de la sepsis, los avances en el terreno terapéutico son limitados.<sup>16</sup>

El tratamiento actual de la sepsis consiste en instalar al paciente en una unidad de cuidado intensivo. La clave para la supervivencia del paciente es la rápida remoción del tejido infectado, y siempre que fuera posible, combinar con un tratamiento antibiótico apropiado. Para manejar la disfunción orgánica y el shock, se aplica en forma inmediata la resucitación con fluidos, con el objeto de revertir la disoxia tisular. La optimización del estado hemodinámico puede incluir transfusiones de sangre y, ocasionalmente, el uso de vasodilatadores.<sup>17</sup>

Luego de los fracasos de los primeros intentos, en los años 2001 y 2002 algunos ensayos clínicos demostraron que es posible reducir la mortalidad de estas patologías y sus resultados se han incorporado a la terapia actual. Uno de ellos involucró el estudio de la resucitación con fluidos y transfusiones, buscando mejorar la perfusión tisular, en pacientes con sepsis en estadios tempranos. Otros dos ensayos analizaron los efectos del control estricto de la glucemia con insulina y la administración de corticoides en pequeñas dosis, sobre todo en pacientes con insuficiencia adrenal, con resultados satisfactorios.<sup>16</sup> Finalmente, en el año 2001 la FDA (*Food and Drug Administration*) de los EUA aprobó el uso de proteína C recombinante humana activada (Drotrecogin-a) para el tratamiento de pacientes con sepsis severa. El tratamiento con esta droga, que funciona como anticoagulante con algunas propiedades antiinflamatorias, disminuyó un 6% la mortalidad a 28 días aunque aumentó el riesgo de hemorragia. Un análisis posterior de los datos demostró que el efecto beneficioso de esta terapia estaba restringido a pacientes con sepsis severa y alto riesgo de muerte. Un segundo ensayo en donde se evaluó el efecto de la droga en pacientes con sepsis severa pero con bajo riesgo de muerte se detuvo en forma prematura debido a la ineficacia de la droga.<sup>18, 19</sup>

A pesar de la disponibilidad de tratamientos antimicrobianos muy efectivos y poderosas estrategias de soporte para el paciente, no se ha conseguido aún una reducción significativa en cuanto a la mortalidad atribuible a la sepsis grave. Esto plantea la necesidad de desarrollar estrategias innovadoras para el tratamiento de dichas complicaciones y conocer los mecanismos moleculares y su regulación. Para tal efecto se requieren, en primer lugar, inves-

tigaciones pre-clínicas como las aquí propuestas. Debido a lo observado con el uso de BZL en el modelo de endotoxemia experimental, se puede pensar en la exploración de su eventual utilidad en otras entidades nosológicas como el modelo planteado de peritonitis séptica seguida de shock.

En este trabajo desarrollamos un modelo murino de sepsis polimicrobiana abdominal en ratones C57BL/6. El modelo de CLP causa peritonitis séptica produciendo shock séptico. Como comentamos anteriormente, este modelo murino semeja más al síndrome séptico humano que el modelo de endotoxemia experimental.<sup>13</sup> Después de la CLP, existe una intensa migración de leucocitos a la cavidad peritoneal. Esta migración en el ratón requiere la participación de citoquinas, como el FNT- $\alpha$ , IL-1 e IL-12.<sup>20</sup> Corroborando nuestros resultados, Gallos y col. demostraron que existe un aumento significativo de FNT- $\alpha$  24 h post-CLP comparado con los valores obtenidos de ratones *sham*.<sup>13</sup>

Como se describió más arriba, en el modelo de endotoxemia, el tratamiento con BZL otorgó protección a los animales desafiados con LPS, aumentando su supervivencia en forma significativa. Cerca del 70% de los animales desafiados con LPS sobrevivió con el tratamiento con BZL. Sin embargo, el modelo de CLP resultó ser más letal y sólo hubo diferencias significativas en cuanto a la supervivencia a las 24 h en los animales tratados con BZL 25 mg/kg de peso con respecto a los que recibieron sólo V. En cuanto a las diferencias entre ambos modelos es fundamental destacar que mientras en la endotoxemia sólo tenemos una respuesta inflamatoria hiperaguda frente a la inoculación de LPS, en el caso de CLP, además de una respuesta similar frente a las endotoxinas liberadas por las bacterias colónicas, existe bacteriemia con posibilidad de siembras sépticas en cualquier órgano de la economía del animal, con la disfuncionalidad consecuente del mismo y la muerte por distintos mecanismos (shock cardiogénico por miocarditis supurada secundaria a una endocarditis, por ejemplo). En disimilitud con el cuadro inducido por el LPS, el modelo de CLP presenta un foco séptico constante.

La dosis utilizada en el modelo de inoculación de LPS fue de 200 mg/kg de peso, por eso decidimos evaluar su efecto inmunomodulador en el modelo de CLP, sin embargo, dicha dosis en este modelo resultó ser tóxica, puesto que los animales mostraron una notable desmejoría con respecto a los grupos que recibían dosis menores.

Evaluamos la producción de NO, ya que su sobreproducción tiene consecuencias tóxicas para los órganos y sistemas y está relacionada con el desarrollo de eventos

patológicos como el shock séptico. Efectivamente, a las 24 h post-CLP, se observó un aumento significativo en la producción de NO en suero, en todos los grupos con CLP con respecto a los controles *sham*. Debe tenerse en cuenta que la producción de NO sérico, es la suma de la producción total del organismo, y probablemente sea ésta la razón por la cual no se encontraron diferencias entre los grupos con CLP.

Paralelamente, también se estudiaron los niveles de FNT- $\alpha$ , puesto que constituye un mediador temprano de la respuesta inflamatoria y uno de los principales en el shock séptico. Además, se ha reportado que concentraciones elevadas de FNT- $\alpha$  en la circulación de pacientes sépticos se correlaciona con un desenlace letal.<sup>21</sup> En la endotoxemia, los ratones desafiados con LPS presentaron un marcado aumento en la producción de FNT- $\alpha$  a los 90 minutos, seguido de una disminución importante a las 4 horas. El tratamiento con BZL dio lugar a una disminución significativa en los niveles de este mediador a los 90 minutos. En el modelo de CLP, este mediador no fue detectado ni a los 90 min ni a las 4 h. Recién a las 24 h post-cirugía se observa que el BZL utilizado a 10 y 25 mg/kg de peso provoca un descenso significativo en los niveles de FNT- $\alpha$  con respecto a los animales que no recibieron tratamiento. Este hallazgo en el grupo tratado con BZL 25 mg/kg de peso se correlacionó con la mejora clínica que presentaban a las 24 h. Sin embargo, BZL 10 mg/kg de peso sería una dosis sub-óptima, ya que los niveles de este mediador se encuentran algo disminuidos, pero la condición clínica de estos animales no es favorable.

Un hallazgo llamativo fue la bacteriemia de los diferentes grupos experimentales a las 24 h post-CLP. El BZL 25 mg/kg de peso logró reducir significativamente este parámetro. Ello sugiere que dicha dosis de BZL estaría desarrollando acciones inmunomoduladoras a punto tal de favorecer una mejor depuración bacteriana en los animales con CLP.

Como mencionamos más arriba, el modelo descripto, no sólo aporta con el fenómeno inflamatorio, también presente en la endotoxemia, sino también con el componente bacteriano. Por eso, para tratar de aclarar y comprender mejor las propiedades inmunomoduladoras de esta droga proponemos realizar un estudio en otro modelo que contemple únicamente el cuadro inflamatorio, de naturaleza no infecciosa como sería el modelo de artritis inducida por colágeno.

Aunque el BZL ha sido utilizado como anti-parasitario por más de 30 años en nuestro país para la enfermedad de Chagas, aún no se han dilucidado completamente ni su mecanismo de acción sobre el parásito ni los mecanismos que participan en la aparición de efectos adversos en el huésped. El trabajo aquí expuesto podría contribuir a la profundización del conocimiento de la actividad inmunomoduladora de la droga, sobre lo cual hemos aportado una serie de datos muy significativos.

#### CONCLUSIONES

El BZL no inhibe el crecimiento bacteriano.

Por lo tanto, la mejoría observada en los animales con CLP tratados con BZL 25 mg/kg de peso comparada con la de animales no tratados, se debería a las propiedades inmunomoduladoras de la droga que se ven reflejadas tanto en la disminución de los niveles de FNT- $\alpha$  como en la bacteriemia.

**Agradecimientos:** Los autores agradecemos a la Dra. María Teresa Ronco por su inestimable colaboración con la CLP así como también a la Srta. Ariana Dávila por su colaboración con el análisis estadístico de los datos. Este trabajo fue subsidiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (BID 1728/OC-AR PICT N°5 17500), Argentina.

(Recibido: febrero de 2008. Aceptado: mayo de 2008)

#### REFERENCIAS

1. Akira S. *Mammalian toll-like receptors*. *Curr Op Immunol* 15: 5-11, 2003.
2. Medzhitov R, Kopp EB. *The toll-receptor family and control of innate immunity*. *Curr Opin Immunol* 11: 11-8, 1999.
3. Bone RC, Balk RA, Cerra FB, y col. *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis*. *The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine*. *Chest* 101: 1644-55, 1992.
4. Vassalli P. *The pathophysiology of tumor necrosis factors*. *Annu Rev Immunol* 10: 411-52, 1992.
5. Fu YX, Chaplin DD. *Development and maturation*



- of secondary lymphoid tissues.* Ann Rev Immunol 17: 399-433, 1999.
6. Aggarwal BB, Natarajan K. *Tumor necrosis factors: developments during the last decade.* Eur Cytokine Netw 7: 93-124, 1996.
  7. Fernandez-Botran R, Chilton PM, Ma Y. *Soluble cytokine receptors: their roles in immunoregulation, disease, and therapy.* Adv Immunol 63: 269-336, 1996.
  8. Moncada S, Higgs A. *The L-arginine-nitric oxide pathway.* N Engl J Med 329: 2002-12, 1993.
  9. Piaggio E, Roggero E, Pitashny M, y col. *Treatment with benznidazole and its immunomodulating effects on Trypanosoma cruzi-infected rats.* Parasitol Res 87: 539-47, 2001.
  10. Revelli S, Le Page C, Piaggio E, y col. *Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down-regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages.* Clin Exp Immunol 118: 271-7, 1999.
  11. Piaggio E, Sanceau J, Revelli S, y col. *Trypanocidal drug benznidazole impairs lipopolysaccharide induction of macrophage nitric oxide synthase gene transcription through inhibition of NF-kappaB activation.* J Immunol 167: 3422-6, 2001.
  12. Pascutti MF, Pitashny M, Nocito A, y col. *Benznidazole, a drug used in Chagas' disease, ameliorates LPS-induced inflammatory response in mice.* Life Sci 76: 685-97, 2004.
  13. Gallos G, Jones DR, Nasr SH, y col. *Local anesthetics reduce mortality and protect against renal and hepatic dysfunction in murine septic peritonitis.* Anesthesiology 101: 902-11, 2004.
  14. Baker CC, Chaudry JH, Gaines HO. *Evaluation of factors affecting mortality rate alter sepsis in a murine cecal ligation and puncture model.* Surgery 94: 331-5, 1983.
  15. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, y col. *Analysis of nitrate, nitrite and nitrate in biological fluids.* Anal Biochem 26: 131-8, 1982.
  16. Cohen J. *The immunopathogenesis of sepsis.* Nature 420: 885-91, 2002.
  17. Annane D, Bellissant E, Cavillon JM. *Septic shock.* Lancet 365: 63-78, 2005.
  18. Rice TW, Bernard GR. *Therapeutic intervention and targets for sepsis.* Annu Rev Med 56: 225-48, 2005.
  19. Aneja R, Fink MP. *Promising therapeutic agents for sepsis.* Trends Microbiol 15: 31-7, 2007.
  20. Burch P, Scott M, Wortz G, y col. *Mortality in murine peritonitis correlates with increased Escherichia coli adherence to the intestinal mucosa.* Amer Surg 70: 333-41, 2004.
  21. Casey LC, Balk RA, Bone RC. *Plasma cytokine and endotoxin levels correlate with survival in patients with sepsis syndrome.* Ann Intern Med 119: 771-8, 1993.

---

*Cuando las contrariedades y la aflicción desesperadas han borrado  
el gusto por la vida, cuando el desgraciado se siente desanimado  
y hundido, cuando desea la muerte y, sin embargo, retiene su vida  
sin amarla, responde a un contenido moral.  
No lo hace por temor, sino por deber.*

KANT