

OBSERVAÇÕES SÔBRE A AÇÃO DA FUADINA E DO MIRACIL D EM CAMUNDONGOS EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *SCHISTOSOMA MANSONI*

Z. BRENER

(Do D. N. E. Ru.)

Em um trabalho anterior, BRENER, PELLEGRINO & OLIVEIRA (1956) aplicaram, como método de avaliação de atividade terapêutica, em uma pequena série de animais, a técnica de isolamento e contagem de granulomas de fígado de camundongos descrita por PELLEGRINO & BRENER (1957). Foi então mostrado que em um grupo de camundongos tratados com Fuadina na dose de 125 mg/kg de peso, 2 vezes ao dia, durante 5 dias, o número de granulomas isolados foi significativamente menor que no grupo controle. No presente trabalho são apresentados novos dados obtidos com o método de isolamento de granulomas na terapêutica experimental da esquistossomose mansoni, sendo também descritos os métodos gerais usados.

MATERIAL E MÉTODOS

Os camundongos foram inoculados com cercárias obtidas de exemplares de *Australorbis glabratus* e concentradas em funis de BUCHNER com placas de porosidade média (PELEGRINO & MACEDO, 1955); a determinação do número de cercárias foi feita colhendo-se 3 a 5 amostras de 0,10 ml da suspensão concentrada que eram distribuídas em gotas sobre lâminas e contadas à lupa. As vias de inoculação usadas foram a percutânea e a intraperitoneal.

Nos camundongos sacrificados procedia-se à exposição das vísceras anotando-se o aspecto da superfície do fígado. Por meio de estilete retiravam-se os vermes do tronco da veia porta e dos ramos mesentéricos. O fígado era retirado e pesado, sendo a pesquisa dos vermes de localização intra-hepática feita por esmagamento de fragmentos entre duas placas de vidro. Os granulomas eram isolados do fígado inteiro ou de um fragmento correspondente a 1/3 ou 1/5 do peso total do órgão. O esmagamento não interfere com o isolamento.

Os granulomas eram contados diretamente em placa de Petri, após o seu isolamento, ou eram conservados em formol a 10% para contagens posteriores. Em algumas ocasiões, quando o número de granulomas era muito pequeno, a contagem dos mesmos era feita diretamente quando o fígado era esmagado entre placas de vidro.

Trabalho do Centro de Pesquisas de Belo Horizonte, Instituto Nacional de Endemias Rurais.

Recebido para publicação em outubro, 1957.

Em uma das séries de camundongos nos quais foi feita a contagem de granulomas, foi realizada, também, a contagem de ovos localizados no intestino, usando-se, para o isolamento dos ovos, a técnica descrita por PELLEGRINO (1956): o intestino (reto e delgado) era retirado e aberto longitudinalmente, sendo colocado em soro fisiológico e mantido em estufa a 37°C durante 2 horas. Em seguida, com o auxílio de uma lâmina de vidro, raspava-se a mucosa até a desintegração completa do tecido intestinal. A suspensão obtida era submetida ao liquidificador por 2 minutos, passada através de uma peneira de malhas metálicas (U.S. Std. 100) e recolhida em placa de Petri. Por sedimentações sucessivas, acompanhadas na lupa, eram obtidos os ovos limpos e concentrados. A contagem era feita colhendo-se 3 amostras de 0,10 ml do material sedimentado, que eram examinadas ao microscópio com fraco aumento, entre lâmina e lamínula.

Avaliação da atividade esquistossomicida de drogas por meio da contagem de granulomas

O método empregado está baseado no fato de que a presença de ovos no fígado condiciona uma reação tissular que dá origem aos típicos granulomas esquistossomóticos. A ação esquistossomicida de uma droga, interrompendo ou diminuindo a postura, pode, então, ser revelada pelo menor número de granulomas encontrado no fígado. A administração do medicamento deverá ser feita antes da chegada de um grande número de ovos ao fígado. Estudos realizados em camundongos (BRENER, 1956) mostraram que a postura se inicia em torno do 34º dia de infecção, aparecendo os primeiros granulomas no fígado cerca de 40 dias após a inoculação. Nas primeiras fases da infecção predominam, no parênquima hepático, os ovos livres sobre os granulomas, alterando-se, posteriormente, essa relação. Após os 50 dias o número de granulomas se mantém muito alto, reduzindo-se enormemente o número de ovos livres, em consequência, possivelmente, da migração dos vermes.

Com base nesses dados, a aplicação das drogas a serem testadas deve ser iniciada aos 32 dias de infecção, estendendo-se a medicação, sempre que possível, por 5 dias no mínimo, sendo os camundongos sacrificados aos 52 dias de doença. A fim de testar o método foi resolvido empregar, de início, drogas de ação esquistossomicida comprovada, sendo escolhidas a Fuadina e o Miracil D.

RESULTADOS

Experiências com a administração de Fuadina

- a) Camundongos foram inoculados, por via percutânea, com 200 cercárias e divididos em 4 grupos. Em 3 grupos a Fuadina foi administrada, por via intraperitoneal, nas doses de 50 mg/kg, 10 mg/kg e 150 mg/kg, 2 vezes ao dia, durante 5 dias. Um dos grupos foi mantido como controle. Na tabela I estão expostos os resultados obtidos, observando-se nítida relação entre o número de granulomas e ovos, e a dose do medicamento.
- b) Camundongos inoculados com 100 cercárias, por via intraperitoneal, foram divididos em 2 grupos mantendo-se um deles como controle. Nos camundongos restantes aplicou-se, por via intraperitoneal, uma dose única de 300 mg/kg de Fuadina. Os resultados estão expostos na

tabela II. A diferença entre as médias é estatisticamente significativa ao nível 0,1%.

- c) Camundongos inoculados com 200 cercárias, por via intraperitoneal, foram divididos em 2 grupos, sendo conservado um deles para controle. Nos camundongos restantes foi feito o tratamento com Fuadina, 150 mg/kg, 2 vezes ao dia, durante 5 dias, sendo, porém, dadas duas séries do medicamento: a primeira aos 32 dias de infecção e a segunda, aos 45 dias. Os resultados estão expostos na tabela III.
- d) Em um grupo de camundongos inoculados com 200 cercárias por via intraperitoneal, a Fuadina foi administrada na dose de 150 mg/kg, 2 vezes ao dia, durante 5 dias, sendo, porém, o tratamento iniciado aos 52 dias de infecção. A diferença entre as médias de granulomas obtidos no grupo controle e no grupo testemunha não é estatisticamente significativa. Os resultados estão expostos na tabela IV.

Tratamento com Miracil D

Dois grupos de camundongos inoculados, por via intraperitoneal, com 200 cercárias foram tratados com o cloridrato de Miracil D. O medicamento, dissolvido em água destilada, foi administrada, por via oral, através de uma sonda fina de polietileno montada em seringa, sendo os camundongos previamente submetidos a anestesia ligeira pelo éter. Foram seguidos dois esquemas: administração diária (uma vez por dia) de 200 mg/kg durante 4 dias e administração de uma dose única de 400 mg/kg. Os resultados estão expostos na tabela V, podendo ser observada nítida redução do número de granulomas nos grupos tratados.

TABELA I

Número de granulomas (fígado), ovos (intestino) e vermes em camundongos submetidos à terapêutica pela Fuadina (50, 100 e 150 mg administrados 2 vezes ao dia durante 5 dias) e em controles.

N.º DE CAMUNDONGOS	Dose total de Fuadina (mg/kg)	Granulomas (fígado)	Ovos (intestino)	Vermes
1.....	—	2 252	10 290	56
2.....	—	3 236	—	—
3.....	—	1 928	13 650	32
4.....	—	3 580	17 700	40
5.....	—	1 416	16 650	33
6.....	—	1 956	16 330	31
7.....	—	2 660	10 140	25
8.....	—	8 084	19 000	32
9.....	—	4 624	18 040	28
10.....	—	2 152	17 600	37
MÉDIA.....		3 188	15 488	34,7
1.....	500	920	9 200	42
2.....	500	720	4 900	44
3.....	500	176	2 500	34
4.....	500	1 228	4 510	47
5.....	500	1 300	8 740	35
6.....	500	1 104	5 890	37
7.....	500	872	4 500	48
8.....	500	692	3 060	37
9.....	500	452	3 780	23

MÉDIA		829	5 231	39,6
1.....	1 000	108	900	32
2.....	1 000	556	66	0
3.....	1 000	544	3 150	21
4.....	1 000	220	680	36
5.....	1 000	164	1 140	12
6.....	1 000	52	640	20
7.....	1 000	380	14	5
8.....	1 000	172	133	—
MÉDIA		274	840	24,4
1.....	1 500	68	400	23
2.....	1 500	152	360	13
3.....	1 500	108	0	2
4.....	1 500	184	295	11
5.....	1 500	0	240	21
6.....	1 500	608	560	35
7.....	1 500	76	400	20
MÉDIA		213	322	17,8

TABELA II

Número de granulomas e vermes obtidos em camundongos tratados com uma dose única de Fuadina (300 mg/kg) e em contróles.

N.º DE CAMUNDONGOS	TRATADOS		CONTRÓLES	
	Granulomas	Vermes	Granulomas	Vermes
1.....				
2.....	270	5	280	3
3.....	49	4	325	2
4.....	0	5	1 036	8
5.....	0	3	240	3
6.....	436	2	24	1
7.....	0	0	0	0
8.....	280	6	0	0
9.....	120	3	2 568	5
10.....	801	11	1 048	15
11.....	296	2	1	1
12.....	0	0	1 748	18
13.....	808	9	444	3
14.....	651	10	624	5
15.....	912	11	987	11
16.....	1 172	34	690	2
17.....	400	4	550	3
18.....	720	4		
19.....	40	2		
20.....	576	2		
21.....	7	2		
22.....	1 125	4		
23.....	688	4		
24.....	284	6		
25.....	784	5		
26.....	0	0		
27.....	820	2		
28.....	0	8		
29.....	0	0		
30.....	0	6		
MÉDIA	388	5,3	660	5,0

TABELA III

Número de granulomas e de vermes em camundongos tratados pela Fuadina (150 mg/kg, 2 vezes ao dia durante 5 dias) em 2 séries (aos 32 e 45 dias)

N.º DE CAMUNDONGOS	TRATADOS		CONTRÔLES	
	Granulomas	Vermes	Granulomas	Vermes
1.....	0	0	4 310	18
2.....	0	0	1 749	8
3.....	0	0	376	3
4.....	125	0	1 725	11
5.....	0	0	1 188	13
6.....	0	0	1 072	0
7.....	0	0	372	3
8.....	0	0	904	5
9.....	0	0	1 557	2
10.....	0	0	104	7
11.....	50	0	536	7
12.....	0	0	1 096	7
13.....	0	0	1 020	6
14.....	0	0	350	5
15.....	0	0	392	0
16.....	0	0		
17.....	0	0		
18.....	0	0		
19.....	0	0		
20.....	0	0		
21.....	0	0		
22.....	0	0		
23.....	172	0		
24.....	0	0		
25.....	10	0		
26.....	42	0		
27.....	0	0		
28.....	0	0		
29.....	0	0		
30.....	0	0		
31.....	0	0		
32.....	0	0		
33.....	0	0		
MÉDIA.....	12,0	0	1 116,7	6,3

TABELA IV

Número de granulomas e vermes em camundongos tratados com Fuadina aos 52 dias de infecção (150 mg/kg, 2 vezes ao dia, durante 5 dias) e em contrôles.

N.º DE CAMUNDONGOS	TRATADOS		CONTRÔLES	
	Granulomas	Vermes	Granulomas	Vermes
1.....	4 024	8	4 587	31
2.....	0	5	975	14
3.....	1 868	2	2 082	35
4.....	1 083	2	1 284	3
5.....	1 884	3	2 505	6
6.....	3 175	8	3 456	11
7.....	4 068	6	2 252	18
8.....	3 215	3	1 756	4
9.....	2 943	5	2 178	12
10.....	1 182	3	1 876	2
11.....	1 572	4	2 019	10
12.....	1 782	5	0	5 (0)
13.....	1 065	4	3 315	8
14.....	0	3	1 820	8
15.....	2 962	4	2 565	2
16.....	440	0	2 484	5
17.....			2 624	2
MÉDIA.....	1 954	4,0	2 222	10,3

TABELA V

Número de granulomas e de vermes em camundongos tratados com Miracil D (200 mg/kg durante 4 dias e dose única de 400 mg/kg) e em controles.

N.º DE CAMUNDONGOS	CONTRÔLES		TRATADOS COM 200 mg/kg (4 dias)		TRATADOS COM 400 mg/kg (dose única)	
	Granulomas	Vermes	Granulomas	Vermes	Granulomas	Vermes
1.....	76	0	1 720	12	480	4
2.....	1	4	0	0	133	4
3.....	488	6	386	8	0	0
4.....	1 115	15	237	1	0	2
5.....	71	2	0	1	0	0
6.....	492	14	0	0	0	3
7.....	440	6	0	2	1 276	29
8.....	258	4	82	7	65	2
9.....	831	7	0	0	27	0
10.....	1 500	14	283	16	169	0
11.....	1 196	20	0	0	428	3
12.....	812	8	193	2	116	3
13.....	2 631	27	0	0	0	1
14.....	738	15	0	0	468	10
15.....	0	3	300	1	0	4
16.....	1 155	16	0	0	588	1
17.....	900	8			24	3
18.....	496	9			14	0
19.....	125	2				
MÉDIA.....	701	9,4	200	3,1	210	3,7

DISCUSSÃO

Como já foi dito, no "screening" de drogas para determinação de atividade anti-parasitária o aspecto mais importante reside no fato de que deve ser escolhida uma técnica que permita demonstrar efeitos mesmo limitados ou parciais das drogas. Ao que se sabe, a ação esquistossomícida, pelo menos das drogas atualmente conhecidas, se inicia produzindo alterações dos órgãos sexuais dos vermes com interferência no fenômeno da postura de ovos e alterando o seu tonus muscular; nesse último caso os vermes são levados ao fígado e imobilizados, sendo a desintegração dos mesmos provocada pela infiltração leucocitária (Standen, 1953). Devido a esse fato, o número de vermes, tomado como elemento isolado, aparentemente não constitui um bom critério de atividade terapêutica, pois drogas de ação não muito acentuada — cuja ação deve ser mostrada pelo "screening" — podem determinar as alterações descritas sem alterar o número de vermes. Baseados nesses dados SCHUBERT (1948, 1948a) e Standen (1953, 1955a) adotaram uma técnica de "screening" que leva em consideração a migração dos vermes para o fígado em consequência da ação medicamentosa, ou seja, a distribuição dos vermes no fígado, veia porta e veias mesentéricas.

A contagem de granulomas, tal como é feita, representa, em última análise, um reflexo da capacidade de postura dos vermes, diminuída ou abolida por ação de medicamentos eficazes. A necessidade de iniciar o tratamento antes da chegada de um grande número de ovos ao fígado explica a presença ainda de granulomas com doses altas do medicamento (tabela I) já que iniciando o tratamento aos 32 dias, como o fazemos, um certo número de vermes ainda per-

manece imaturo e menos sensível à ação dos medicamentos, como já assinalaram, entre outros, KIKUTH & GONNERT (1948) e STANDEN (1956).

Tanto isso é verdade que a administração do antimonial em duas séries, aos 32 e 45 dias, alcançando, portanto, a segunda série a totalidade dos vermes já amadurecidos, reduz enormemente o número de granulomas (tabela III), tornando mais significativos os resultados. O início do tratamento aos 52 dias não reduz, como, aliás, já era previsto, o número de granulomas, pois que nessa fase já teve lugar a chegada dos ovos ao fígado. O fato de que doses de apenas 50 mg/kg de Fuadina e de que uma dose única de 300 mg/kg, correspondente a 1/5 da dose habitualmente dada, tenham baixado significativamente o número de granulomas, indica, aparentemente, que o método é capaz de indicar ações parciais do medicamento.

Em nossa experiência, a administração de Miracil D na dose única de 400 mg/kg e a administração de 200 mg/kg durante 5 dias proporcionaram resultados sensivelmente semelhantes. É interessante assinalar que para KIKUTH & GONNERT (1948) uma dose única de 335 mg/kg apresenta eficácia terapêutica maior que 6 doses repetidas de 62,5-125 mg/kg. STANDEN (1953) empregou dose única de 500 mg/kg, obtendo curas aparentes com recidivas após 15 dias, sendo, porém, encontrados apenas machos; com 100 mg/kg, 2 vezes ao dia, durante 5 dias, houve migração pronunciada dos vermes para o fígado, porém, muitos deles continuaram vivos. De um modo geral, nas pesquisas realizadas com a administração dessa tio-xantona, ressalta a dificuldade em se obterem curas das infecções, embora sejam observadas com relativa facilidade manifestações de atividade terapêutica, tais como o deslocamento dos vermes para o fígado e interrupção da postura.

SUMÁRIO

São descritos os resultados obtidos em terapêutica experimental da esquistossomose mansoni aplicando-se o método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. Com a finalidade de padronizar e testar o método, foram empregados a Fuadina e o Miracil D.

Empregando-se a Fuadina nas doses de 50, 100 e 150 mg/kg (2 vezes ao dia, durante 5 dias), a partir do 32º dia após a inoculação, observou-se nítida relação entre a dose administrada e a redução no número de granulomas, ovos e vermes. Redução do número de granulomas ainda mais evidente foi obtida quando o medicamento foi dado em duas séries, aos 32 e 45 dias de infecção. Tratando os camundongos mais tardiamente, aos 52 dias, quando os ovos já atingiram o fígado dando origem aos granulomas, a diferença obtida entre o número de granulomas nos grupos tratado e controle não foi estatisticamente significativa, confirmando o que era esperado.

Administrando-se o Miracil D nas doses de 200 mg/kg (durante 4 dias) e 400 mg/kg (dose única), foi observada redução significativa no número de granulomas.

Os dados obtidos confirmam o valor do método de isolamento de granulomas para avaliação da atividade de drogas em terapêutica experimental ("screening").

SUMMARY

There have been given the results achieved in experimental therapeutics for schistosomiasis mansoni using the method for isolating schistosome granuloma from mice livers. With a view to standardize and check the method under study there have been employed Fuadin and Miracil D.

Using Fuadin in doses of 50, 100 and 150 mg/kg (twice a day, for 5 days) from the 32nd after inoculation it has been observed a marked relationship between the doses given and the decrease in the number of granulomas and worms. That decrease was even more sensible when the drug was given in two series, starting on the 32nd and 45th day after inoculation. Treating mice with 52 days of infection, when the eggs had already reached the liver, giving origin to granulomas, the difference between the number of granulomas of the treated and untreated mice was not statistically significant, as it was expected.

Miracil D, in doses of 200 mg/kg (for four days) and 400 mg/kg (single dose) also provided a sensible reduction in the number of granulomas.

The data obtained emphasizes the availability of the isolation of granulomas from mice livers in the screening of drugs in experimental therapeutics for schistosomiasis mansoni.

BIBLIOGRAFIA

- BRENER, Z. — 1956 — Observações sôbre a infecção do camundongo pelo *Schistosoma mansoni*. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. (Em public.).
- BRENER, Z., PELLEGRINO, J. & OLIVEIRA, FIDALMA C. — 1956 — Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. Aplicação do método de isolamento de granulomas do fígado de camundongos. Rev. Bras. Malariol. Doenças Trop. (Em public.).
- KIKUTH, W. & GONNERT, R. — 1948 — Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. Ann. Trop. Med., 42:256-267.
- PELLEGRINO, J. — 1956 — The intradermal test in the diagnosis of schistosomiasis. African Conference on Schistosomiasis (Brazzaville, November, 1956).
- PELLEGRINO, J. & MACEDO, D. G. — 1955 — A simplified method for the concentration of cercariae. J Parasit., 41:329-330.
- PELLEGRINO, J & BRENER, Z. — 1957 — Method for isolating granulomas from mouse liver. J. Parasit., 42:564.
- SCHUBERT, M. — 1948 — Conditions for drug testing in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am. J. Trop. Med., 28:121-136.
- SCHUBERT, M. — 1948a — Screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. Am. J. Trop. Med., 28:137-156.
- STANDEN, O. D. — 1953 — The relationship of sex in *Schistosoma mansoni* to migration within the hepatic portal system of experimentally infected mice. Ann. Trop. Med., 47:139-145.
- STANDEN, O. D. — 1955 — The progress of degenerative changes in schistosomes following the treatment of experimental infections with 1:7 - bis (p - dimethyl amino phenoxy) heptane. Tr. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 49:416-423.