

TERAPÊUTICA EXPERIMENTAL DA ESQUISTOSSOMOSE. X — AÇÃO DA DIAMINODIFENILSULFONA (DDS) NA ESQUISTOSSOMOSE EXPERIMENTAL

J. PELLEGRINO (1) e Naftale KATZ (2)

RESUMO

Na triagem empírica de drogas foi observado que a diaminodifenilsulfona (DDS) é capaz de interromper a postura do *Schistosoma mansoni* em camundongos, hamsters e macacos *Cebus* experimentalmente infectados. No camundongo, esta atividade foi evidente mesmo na dose de 0,05% de DDS incorporado à dieta. A ação supressiva foi transitória, desaparecendo imediatamente após a suspensão da droga. Levantamento parasitológico em leprosos, sob tratamento específico, revelou um número surpreendentemente baixo de indivíduos parasitados por helmintos intestinais. Todavia, ensaios clínicos preliminares, em pequeno número de pacientes esquistossomóticos e com outros helmintos intestinais, não demonstraram qualquer atividade do DDS. Pesquisas visando o encontro de derivados do DDS com maior atividade sobre o *S. mansoni* e outros helmintos devem ser encorajados.

INTRODUÇÃO

A triagem empírica de drogas, realizada como rotina em nossos laboratórios, tem permitido o encontro de uma série de agentes esquistossomicidas. As drogas que se mostram ativas nesta fase inicial, realizada em camundongos, são posteriormente testadas, novamente em camundongos e depois em hamsters e macacos *Cebus*, no que se convencionou chamar de ensaios pré-clínicos (PELLEGRINO & KATZ⁶).

Em ensaios realizados em nossos laboratórios, a diaminodifenilsulfona (DDS) mostrou particular atividade supressora sobre a postura do *Schistosoma mansoni*.

Baseado neste achado, foi também realizado levantamento parasitológico numa colônia de leprosos (onde o DDS é usado como

agente terapêutico específico), bem como ensaios preliminares em pacientes com esquistossomose ou com outras helmintoses. Os dados obtidos serão aqui apresentados.

MATERIAL E MÉTODOS

Infecção dos animais

No presente estudo foram usadas cercárias eliminadas por *Biomphalaria glabrata* criadas e infectadas em laboratório (cepa LE de *S. mansoni*). Camundongos albinos, pesando cerca de 20 g foram expostos a 120 cercárias pelo método da imersão da cauda (PELLEGRINO & KATZ⁶). Hamsters adultos (*Cricetus auratus*) foram infectados com 60 cercárias pelo método da bolsa alimentar

Trabalho realizado com o auxílio do Conselho Nacional de Pesquisas, Brasil, e do U.S. Army (Grant n.º DADA-17-73-G-9378). Contribuição n.º 57 do Grupo Inter-departamental de Estudos sobre Esquistossomose

- (1) Grupo Inter-departamental de Estudos sobre Esquistossomose, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte
 - (2) Centro de Pesquisas "René Rachou", INERu, FIOCRUZ, Belo Horizonte
- Endereço para separatas: GIDE — Caixa Postal 1404 — 30000 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

(PELLEGRINO, DE MARIA & FARIA⁹). A via percutânea foi usada para expor (200 cercárias por animal) dois *Cebus apella macrocephalus* Spix, 1823.

Tratamento dos animais infectados

Grupos de 15 camundongos foram tratados com DDS nas doses de 100, 50 e 25 mg/kg/dia x 5, *per os*. Os hamsters receberam idêntico tratamento nas doses de 400, 150 e 100 mg/kg/dia x 5, *per os*. Um dos macacos *Cebus* foi tratado por via oral, durante 5 dias consecutivos, com a dose de 60 mg/kg; o outro animal recebeu 15 mg/kg durante 14 dias, também por via oral.

Sete semanas depois da exposição, dois grupos de 25 camundongos foram tratados, por 30 dias consecutivos, com DDS incorporado à dieta na proporção de 0,05% e 0,025%, respectivamente. Em diferentes períodos durante o tratamento e depois de terminado o mesmo, grupos de 5 animais foram sacrificados para o estudo dos seguintes parâmetros: número médio de vermes, distribuição dos esquistossomos no sistema porta e alterações do oograma.

Um grupo de 70 camundongos, 7 semanas após a infecção, foi tratado com DDS, *per os*, por 5 dias consecutivos (dose de 10 mg/kg/dia). Um dia antes do tratamento e cada dia depois, grupos de 4 camundongos foram sacrificados e a porcentagem de ovos imaturos, assim como o número médio de esquistossomos e a distribuição dos mesmos no sistema porta, determinado.

Oograma e distribuição dos esquistossomos

De acordo com o esquema experimental, os camundongos e hamsters foram sacrificados por fratura cervical em épocas diferentes. Os esquistossomos localizados no sistema porta foram recolhidos por perfusão, de acordo com a técnica de PELLEGRINO & SIQUEIRA¹⁰. Alterações do oograma, em fragmentos intestinais de camundongos e hamsters, foram consideradas significativas quando faltavam um ou mais estádios evolutivos de ovos viáveis de *S. mansoni* (PELLEGRINO & KATZ⁷). Nos macacos *Cebus*, a avaliação da atividade terapêutica foi baseada no desaparecimento gradual dos ovos e diminuição

do número de ovos imaturos por grama de fragmentos intestinais retirados por curetagem retal (KATZ, PELLEGRINO & MEMÓRIA³).

Levantamento parasitológico e ensaios clínicos

Foram realizados, em 86 leprosos internados na Colônia Santa Izabel, Minas Gerais, exame de fezes parasitológico pelo método de KATO, modificado por KATZ & col.². Estes pacientes estavam sendo submetidos a tratamento específico contra a lepra, com diferentes drogas e esquemas terapêuticos, porém, na sua grande maioria, recebiam DDS.

A 2 pacientes (adultos jovens) com esquistossomose mansoni ativa, o DDS foi ministrado na dose de 200 mg/dia x 7. Em fragmentos retais, colhidos por biópsia, foi realizado o oograma, antes e 7 dias após o término do tratamento.

A 14 crianças com parasitoses intestinais múltiplas foi administrado o DDS na dose de 100 mg/dia x 5 (3 a 5 mg/kg de peso/dia). O controle parasitológico foi baseado em um único exame de fezes pelo método do MIF realizado antes e uma semana após o término do tratamento.

RESULTADOS

A Tabela I mostra que o DDS apresenta nítida ação sobre a postura do *S. mansoni* quando administrado por via oral a camundongos infectados. É interessante notar que, entretanto, somente na dose de 100 mg/kg (na qual houve alterações do oograma em todos os animais) ocorreu deslocamento significativo dos esquistossomos para o fígado.

Em hamsters (Tabela II), a ação do DDS foi menos evidente, sendo necessária uma dose 4 vezes maior para produzir, em 75,0% dos animais tratados, alterações no oograma.

No *Cebus* tratado com 60 mg/kg/dia x 5, por via oral, houve nítida ação parcial do DDS, com diminuição significativa do número de ovos viáveis. No animal que recebeu 15 mg/kg/dia, por 2 semanas consecutivas, houve apenas uma supressão transitória da postura (Tabela III).

TABELA I

Atividade anti-esquistossomótica do DDS em camundongos experimentalmente infectados pelo *S. mansoni*

Esquema de tratamento (mg/kg/dia) p.o.	Número de camundongos	Animais mortos	Número médio de vermes	Distribuição de esquistossomos (%)			Porcentagem de animais c/alteração do oograma
				Fígado	Porta	Vasos mesentéricos	
100	15	6	31,2	44,8	17,9	37,3	100,0
50	15	6	36,8	18,4	21,1	60,5	44,4
25	15	6	34,9	19,4	26,1	54,5	22,2
Controle	15	0	32,4	20,4	28,3	51,3	0,0

TABELA II

Atividade anti-esquistossomótica do DDS em hamsters experimentalmente infectados pelo *S. mansoni*

Esquema de tratamento (mg/kg/dia) p.o.	Número de animais	Animais mortos	Número médio de vermes	Distribuição de esquistossomos (%)			Porcentagem de hamsters c/alteração do oograma
				Fígado	Porta	Vasos mesentéricos	
400	6	2	38,4	18,3	23,5	58,2	75,0
150	5	0	22,2	13,5	34,2	52,3	40,0
100	5	0	24,6	16,2	27,0	56,8	0,0
Controle	5	0	29,7	21,3	32,6	46,1	0,0

TABELA III

Atividade anti-esquistossomótica do DDS incorporado à dieta (0,05%)

Número de camundongos	Dias depois do começo (+) do tratamento ou depois (++) do mesmo	Número médio de vermes	Distribuição de esquistossomos (%)			Porcentagem de animais com alteração do oograma
			Fígado	Porta	Vasos mesentéricos	
5	+ 10	24,6	43,9	6,5	49,6	100,0
5	+ 16	11,8	32,2	27,1	40,7	100,0
5	+ 27	19,6	24,5	31,6	43,9	100,0
5	++ 4	25,0	17,0	9,0	74,0	0,0
5	++ 15	15,3	37,7	16,4	45,9	0,0
10	controle (*)	22,9	19,5	12,4	68,1	0,0

(*) Sacrificados 10 semanas após a infecção

TABELA IV

Atividade anti-esquistossomótica do DDS em macacos *Cebus* experimentalmente infectados pelo *Schistosoma mansoni*

Macaco	Esquema de tratamento	Tempo de infecção	Dias antes (-) ou após (+) o término do tratamento	Estágio dos ovos viáveis					Número total de ovos viáveis por grama de tecido retal	Observações
				1.º	2.º	3.º	4.º	Maduros		
I	60 mg/kg/dia x 5	7 meses	- 25	8	4	2	1	81	5000	Interrupção temporária da postura. Recidiva.
			0	1	24	13	4	104	5255	
			+ 5	0	0	0	0	22	957	
			+ 10	0	0	0	0	0	0	
			+ 16	1	1	0	0	7	352	
			+ 23	0	0	0	0	4	213	
			+ 68	0	0	0	0	25	1086	
+122	0	3	0	5	3	660				
II	15 mg/kg/dia x 14	7,5 meses	- 41	43	17	101	20	85	13039	Interrupção transitória da postura (durante o tratamento)
			0	82	34	34	13	177	12057	
			+ 3	18	58	119	20	360	11500	
			+ 7	1	25	21	22	138	7528	
			+ 11	0	0	0	0	84	245	
			+ 14	34	77	56	8	93	12884	
+ 22	37	8	24	13	60	6367				

Como pode ser visto na Tabela IV, no grupo de camundongos tratados com o DDS incorporado à dieta (0,05%), alterações do oograma foram observadas em todos os animais sacrificados 10, 16 e 27 dias depois do início do tratamento. Entretanto, houve recuperação da postura (oograma normal) nos animais examinados 4 e 15 dias após o término do tratamento. Não foi constatada atividade do DDS quando a concentração na dieta foi de 0,025%.

A Fig. 1 resume os resultados obtidos no grupo de 70 camundongos tratados com DDS por 5 dias consecutivos, via oral, na dose de 100 mg/kg/dia. Alterações de oograma foram observadas em 3 dos 4 animais sacrificados 24 horas depois do início do tratamento. No segundo dia todos os animais apresentaram oograma alterado. Considerando-se a porcentagem de ovos imaturos, fica claro, pela Fig. 1, que a recidiva ocorreu logo depois que o tratamento foi interrompido. É interessante salientar que não foram observadas alterações significativas

nas porcentagens de vermes localizados no fígado, bem como do número médio de vermes.

O levantamento parasitológico, realizado em 86 leprosos, revelou um número surpreendentemente baixo de parasitoses intestinais. De fato, apenas 5 estavam parasitados pelo *Ascaris lumbricoides*, 2 por *Taenia sp.*, 4 por *Trichocephalus trichiuris* e 5 por *Schistosoma mansoni*, apesar de viverem em condições higiênico-sanitárias não muito satisfatórias.

Nos dois pacientes com *S. mansoni* tratados com DDS (200 mg/dia x 7), os oogramas (biopsia retal) realizados antes e 7 dias após o tratamento, não mostraram diferenças que pudessem indicar ação da droga sobre a postura dos vermes.

Em 14 crianças poliparasitadas, o resultado dos exames de fezes realizados antes e 7 dias após o término do tratamento revelaram, respectivamente, 10 e 8 com ascariíase, 12 e 11 com ancilostomídeos e 10 e 9 com tricocefalíase.

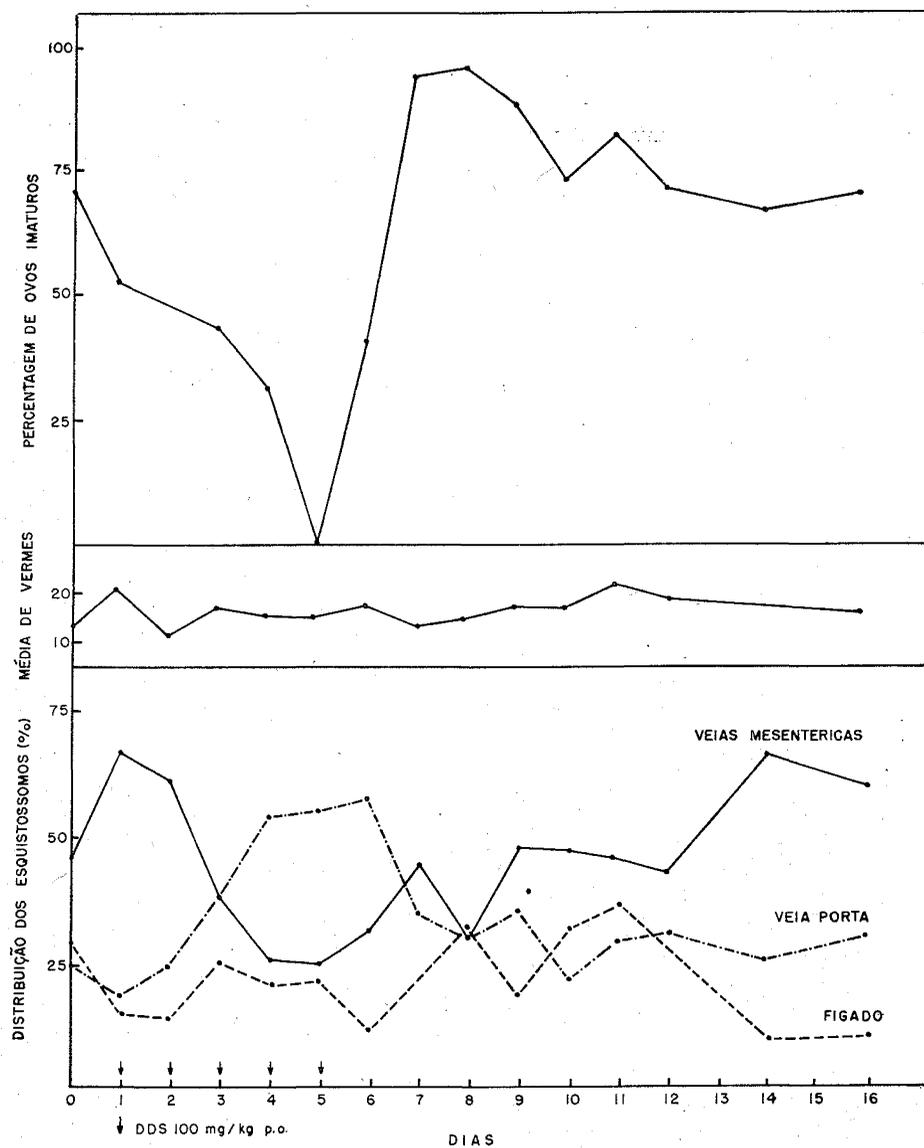


Fig. 1 — Atividade anti-esquistossomática do DDS (100 mg/kg/dia x 5, p.o.) em camundongos experimentalmente infectados. A parte superior mostra que houve interrupção da postura, mas esta voltou logo que a medicação foi interrompida. Na parte média vê-se que o número de esquistossomos não se alterou com o tratamento. Modificações significativas na distribuição dos vermes no fígado, veia porta e veias mesentéricas não foram observadas (parte inferior). Cada ponto representa a média de 4 animais.

DISCUSSÃO

Como foi demonstrado, o DDS age apenas suprimindo a postura do *S. mansoni*, sem exercer atividade letal sobre os esquistossomos. Pode haver discreta modificação na distribuição dos vermes no sistema porta. A ação supressiva, no camundongo, manifestou-se quando a droga foi administrada por via oral, mas foi mais evidente quando o DDS foi incorporado à dieta. Neste caso, ele foi ativo mesmo em concentração muito baixa (0,05%).

Não foi constatada atividade na concentração de 0,025%. É interessante salientar que na literatura existem poucas referências a drogas com ação semelhante à do DDS, isto é, drogas que apresentam apenas ação supressora. Uma delas é o nicarbazin, complexo equimolecular do 4,4'-dinitrocarbanilide e 2-hidroxi-4,6-dimetilpirimidina. Segundo CAMPBELL & CUCKLER¹, a ação supressora se manifesta, em camundongos infectados em *S. mansoni*, quando o nicarbazin é incorporado à dieta na proporção de 0,2%. Em nossos laboratórios a ação supressora do nicarbazin foi confirmada em camundongos e macacos *Cebus* (PELLEGRINO & KATZ⁸).

Uma outra droga que apresenta apenas atividade supressora sobre a postura do *S. mansoni*, sem provocar morte dos mesmos, nem deslocamento para o fígado, é a tiosinamina (PELLEGRINO & MACHADO⁵). Foi demonstrado que a tiosinamina bloqueia o mecanismo de formação dos ovos por inibição de uma enzima que contém cobre, a polifenoloxidase (MACHADO, SILVA & PELLEGRINO⁴). O mecanismo de ação do DDS não é conhecido.

Como o DDS é rotineiramente usado no tratamento de leprosos, foram realizados exames parasitológicos das fezes em pacientes que estavam sendo submetidos a tratamento específico com esta droga. Surpreendentemente, o número de indivíduos parasitados foi muito baixo, levando em conta as condições higiênico-sanitárias da localidade onde vivem. De fato, menos de 10% dos pacientes apresentaram ovos de helmintos nas fezes. Todavia, ensaios clínicos preliminares com DDS realizados em pequeno número de pacientes com esquistossomose e

outros helmintos intestinais não demonstraram atividade da droga nos esquemas empregados.

É possível que o DDS, para agir sobre a postura ou mesmo eliminando os helmintos intestinais, deva ser administrado por tempo prolongado.

Pesquisas visando o encontro de derivados do DDS com maior atividade helminticida devem ser encorajados.

SUMMARY

Experimental chemotherapy of schistosomiasis. X — Antischistosomal activity of diaminodiphenylsulfone (DDS) in laboratory animals and in humans

During a blind screening for potential antischistosomal agents it was observed that diaminodiphenylsulfone (DDS) interferes with the egg-laying of *Schistosoma mansoni* in mice, hamsters and *Cebus* monkeys experimentally infected. In mice the activity was evident when DDS was administered in the diet at a concentration as low as 0.05%. The activity was transitory, disappearing soon after the drug was withdrawn.

A parasitologic survey among lepers under specific treatment revealed a low index of infection by helminths. However, the treatment by DDS of lepers harboring *S. mansoni* infection as well as other intestinal helminths was ineffective.

It was stressed the necessity of further studies aiming to find potential antihelminthic and/or antischistosomal agents in DDS derivatives.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CAMPBELL, W.C. & CUCKLER, A.C. — Inhibition of egg production of *Schistosoma mansoni* in mice treated with nicarbazin. *J. Parasit.* 53:977-980, 1967.
2. KATZ, N.; CHAVES, A. & PELLEGRINO, J. — A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 14:397-402, 1972.
3. KATZ, N.; PELLEGRINO, J. & MEMÓRIA, J.M.P. — Quantitative oogram me-

- thod in *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. *J. Parasit.* 52:917-919, 1966.
4. MACHADO, A.; SILVA, M.L.H. & PELLEGRINO, J. — Mechanism of action of thiosinamine, a new egg suppressive agent in schistosomiasis. *J. Parasit.* 56:392-393, 1970.
 5. PELLEGRINO, J. & MACHADO, A. — Experimental chemotherapy of schistosomiasis. VI — Egg suppressive activity of thiosinamine. *Rev. Brasil. Pesq. Med. Biol.* 5:43-45, 1972.
 6. PELLEGRINO, J. & KATZ, N. — Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. In "Advances in Parasitology", vol. 6 (BEN DAWES ed.), pp. 233-290. London, Academic Press Inc., 1968.
 7. PELLEGRINO, J. & KATZ, N. — Laboratory evaluation of antischistosomal agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 160:429-460, 1969.
 8. PELLEGRINO, J. & KATZ, N. — Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. IV — Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 11:215-221, 1969.
 9. PELLEGRINO, J.; DE MARIA, M. & FARRIA, J. — Infection of the golden hamster with *Schistosoma mansoni* cercariae through the cheek pouch. *J. Parasit.* 51:1015, 1965.
 10. PELLEGRINO, J. & SIQUEIRA, A.F. — Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev. Brasil. Malariol. Doenças Trop.* 8:589-597, 1956.

Recebido para publicação em 20/3/1974.