

ASSOCIAÇÃO DO AMINONUCLEOSÍDIO DA ESTILOMICINA COM A SULFADIAZINA NA TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL DE CAMUNDONGO

E. Plessmann CAMARGO, Maria das Neves R. CARNEIRO e L. H. Pereira da SILVA

RESUMO

Com o objetivo de estudar a associação do aminonucleosídeo da Estilomicina com a sulfadiazina na toxoplasmose experimental de camundongo, os autores determinam preliminarmente as doses médias efetivas (DME) de cada droga, empregando injeções subcutâneas cada 6 horas em animais submetidos a uma dieta carente em ácido fólico, ácido p-aminobenzóico e vitamina B₁₂.

Verificam que a DME da sulfadiazina, nas condições referidas, é da ordem de 1/5 da DME da mesma droga, administrada por via oral a animais mantidos em dieta completa balanceada.

Com relação à associação das drogas, obtêm, em alguns níveis de associação, efeitos aditivos com relação à sobrevida dos animais tratados, não podendo, no entanto, demonstrar êsse efeito em termos quantitativos, em virtude de variações observadas em outros níveis de associação.

INTRODUÇÃO

Embora a ação da Estilomicina sobre o *Toxoplasma gondii* seja conhecida desde os trabalhos de CHRISTEN & THIEMANN¹, apenas recentemente SILVA¹² e SILVA & CAMARGO¹³ mostraram que a fração aminonucleosídeo do antibiótico é a responsável pela sua ação antitoxoplásmica. Embora êstes autores não tenham conseguido demonstrar o mecanismo de ação da droga contra o *Toxoplasma*, tendo falhado as tentativas de reversão da ação da droga em cultura de tecido (SILVA¹²), vários elementos, observados em outros sistemas, sugerem que o aminonucleosídeo interfere no metabolismo das purinas. Entre êsses elementos temos: a sua analogia estrutural com a desoxiadenosina, seu comprovado efeito na inibição da síntese de nucleotídios purínicos no *Trypanosoma cruzi* (FERNANDES & CASTELLANI⁴), sua ação competitiva com o ácido guanílico em *Tetrahymena* (BOTLE & OLESON^{apud} 10) e a possibilidade de reversão da ação do anti-

biótico contra *Trypanosoma equiperdum* pela adenina e outras purinas (HEWITT et al.⁹).

O interesse do encontro de um antipurínico ativo contra o *Toxoplasma* já foi assinalado por um de nós (SILVA¹²). Com efeito, FRENKEL & HITCHINGS⁷ mostraram que contra o *Toxoplasma* as drogas ativas, a saber, as sulfonamidas e a pirimetamina, atuam bloqueando a síntese da coenzima transformilante, que é um derivado do ácido fólico. Esta coenzima, como transportadora de formato, é responsável pela introdução dos carbonos 2 e 8 do anel purínico no processo de síntese "de novo" dos ribonucleotídios purínicos (ver GOLDTHWAIT et al.⁸). As sulfonamidas e os antifólicos determinam portanto perturbações no metabolismo dos ácidos nucleicos, principalmente na biossíntese "de novo" dos ribonucleotídios purínicos, como, por sinal, já foi amplamente demonstrado pelo bloqueio que determinam na incorporação de glicina C¹⁴ nos ácidos nu-

cleicos e pelo acúmulo de produtos do metabolismo intermediário (ver SKIPPER & BENNETT¹⁴). O bloqueio desta via pode favorecer ou estimular a outra via de biossíntese — via de salvação — na qual as purinas e pirimidinas pré-formadas são incorporadas diretamente nos nucleotídeos e que, por sua vez, pode ser bloqueada pelos antipurínicos. Numerosas bactérias, células animais e mesmo protozoários como o *Trypanosoma cruzi* (FERNANDES & CASTELLANI³) são capazes de utilizar ambas as vias de síntese. A utilização concomitante de drogas que atuam nas duas vias de síntese possíveis são teoricamente promissoras. Na prática, vem-se demonstrando que a utilização de antifólicos e antipurínicos, dentro dos referidos critérios, tem levado a resultados muito favoráveis contra bactérias e também em leucemias experimentais.

A demonstração da ação do aminonucleosídeo sobre o *Toxoplasma* sugeriu-nos a sua associação com uma sulfonamida, levando em conta seus prováveis mecanismos de ação.

Entre as sulfonamidas escolhemos a sulfadiazina por ser droga bem estudada na toxoplasmose experimental e por estar bem determinado o mecanismo de ação (FRENKEL & HITCHINGS⁷).

MATERIAL E MÉTODOS

As técnicas de experimentação, bem como as cepas de *Toxoplasma* e camundongos utilizadas foram as mesmas de nosso trabalho anterior (SILVA & CAMARGO¹³). Descrevemos a seguir apenas as particularidades das experiências deste trabalho.

DIETA — Em algumas experiências foi ministrada aos camundongos a dieta completa balanceada referida em nosso trabalho anterior (SILVA & CAMARGO¹³).

Em outras foi empregada uma dieta carente em ácido fólico, ácido p-aminobenzóico (PABA) e vitamina B₁₂, assim constituída: caseína purificada livre de vitaminas — 25%; óleo de amendoim — 10%; açúcar de cana refinado — 60%; mistura salina de Phillips-Hart — 5%; e mais as seguintes vitaminas em mg por kg de dieta: tia-

mina — 10; riboflavina — 10; piridoxina — 10; pantotenato de cálcio — 20; biotina — 0,05; nicotinamida — 50; vitamina K — 10; colina — 500; inositol — 100. Além disto foram administradas, semanalmente, em suspensão oleosa *per os*, aos animais submetidos a este tipo de dieta, 500 unidades de vitamina A, 100 unidades de vitamina D e 1 mg de vitamina E.

Em todas as experiências os camundongos começaram a receber a dieta respectiva uma semana antes da inoculação de toxoplasmas.

DROGAS USADAS — A sulfadiazina foi empregada por via oral ou subcutânea, conforme a experiência. As doses por via oral foram calculadas admitindo-se a ingestão de 4 g de alimento por dia por camundongo adulto. Para a via subcutânea usamos a solução aquosa do sal sódico da sulfadiazina, sendo o pH final da solução ajustado em torno de 7-8.

O aminonucleosídeo da Estilomicina solubilizado em salina foi administrado por via subcutânea.

ESQUEMA DE TRATAMENTO — O tratamento dos animais foi sempre iniciado entre uma a três horas a partir da inoculação de toxoplasmas.

Para estudo dos resultados de associação das drogas, foram determinadas previamente as doses médias efetivas (DME — dose que, no 10.º dia de tratamento, permite a sobrevivência de 50% dos animais inoculados intraperitonealmente com 20.000 toxoplasmas), pelo método gráfico utilizado por EYLES & COLEMAN².

A DME foi determinada para cada uma das drogas nas seguintes condições:

Sulfadiazina — a) por via oral, mistura da à dieta, seja à dieta balanceada completa, seja à dieta carente em PABA e ácido fólico; b) por via subcutânea em injeções intervaladas de 6 horas, ministrando-se aos animais em experiência dieta carente em PABA e ácido fólico.

Aminonucleosídeo — Em injeções subcutâneas, cada 6 horas, em animais submetidos à mesma dieta carente.

A escolha do intervalo de 6 horas entre as injeções foi baseada, para o aminonucleosídeo, na curva de concentração sanguínea desta droga determinada por FERNANDES et al.⁵ e, para a sulfadiazina, na curva de concentração sanguínea desta droga, por nós determinada segundo a técnica de BRATTON & MARSHALL^{apud 6}.

Nas experiências de associação usamos 160 camundongos fêmeas, distribuídos em grupos de 10, variando entre 18,1 e 18,5 o peso médio dos grupos. Em 9 dos 16 grupos foram empregadas as nove combinações possíveis entre as doses equivalentes a 1, 1/2 e 1/4 da DME de cada droga; 3 grupos receberam apenas sulfadiazina e outros 3 apenas aminonucleosídeo em doses equivalentes a 1, 1/2 e 1/4 da DME de cada droga. O grupo restante não foi tratado, tendo servido de controle.

As drogas foram administradas em injeções aplicadas uma imediatamente após a outra. Os grupos que receberam apenas uma das drogas receberam outra injeção de solução salina, enquanto o grupo controle recebeu duas injeções de salina.

RESULTADOS

I — Ação da sulfadiazina sobre a toxoplasmose experimental de camundongos.

1) *Ação da sulfadiazina por via oral, misturada à dieta* — No Quadro I acham-se resumidos os dados da experiência para determinação das doses médias efetivas da sulfadiazina, via oral e comparação da ação desta droga em duas condições diferentes de dieta, a saber, dieta completa e dieta carente em PABA e ácido fólico. Como se pode notar, nas doses de 64 e 125 mg, por kg de peso, por dia, houve aparentemente melhor atividade da sulfadiazina administrada em dieta carente. Nos grupos de 32 mg/kg/dia, deu-se o inverso, mas, comparando-se os grupos I e V (contrôle), pode-se ver que os controles sobreviveram mais que os tratados, o que de certo modo prejudica os dados de sobrevivência do grupo I, uma vez que a dose de sulfadiazina administrada foi seguramente não tóxica. Portanto o resultado do tratamento se nos pareceu melhor, quando a dieta dos animais foi carente em PABA e ácido fólico.

2) *Ação da sulfadiazina por via subcutânea* — a) Determinação das doses por via subcutânea: Na Fig. 1 acha-se expressa a curva da concentração sanguínea da sulfadiazina livre, no sangue de camundongos, após 3 injeções, com intervalos de 8 horas, de 1,25 mg de sulfadiazina cada uma, no volume de 0,2 ml via subcutânea.

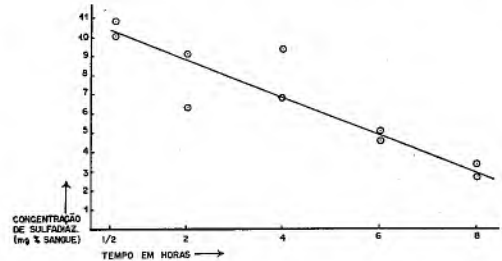


Fig. 1 — Curva de concentração sanguínea da sulfadiazina. Foram feitas 3 injeções subcutâneas de 0,2 ml de solução aquosa do sal sódico de sulfadiazina, contendo 1,25 mg da droga. Injeções intervaladas de 8 horas, sendo o momento da última injeção considerado, no gráfico, como o início dos tempos. (Cada ponto representa um camundongo.)

Pelo resultado das dosagens, pode-se verificar que o nível sanguíneo máximo foi atingido rapidamente, dentro de 30 minutos a partir da última injeção, caindo, em seguida, à metade dentro de 6 horas e a 1/3 depois de 8 horas. Em vista disto, escolhemos o intervalo de 6 horas para as injeções subcutâneas de sulfadiazina, uma vez que intervalos menores acarretariam, além de prejuízo para os animais por manuseio excessivo, grandes dificuldades de execução.

b) Determinação da DME da sulfadiazina, via subcutânea, em animais submetidos a dieta carente em PABA e ácido fólico: No Quadro II acham-se resumidos os resultados obtidos na determinação da DME da sulfadiazina via subcutânea. O resultado obtido (DME = 10 mg/kg de peso/dia) coincidiu com a dose mínima empregada, o que prejudica o cálculo gráfico e não oferece grande precisão. Mas, como se pode notar, a administração da droga por via subcutânea a animais em dieta carente faz baixar a sua DME para níveis próximos de 1/5 da DME obtida por via oral, em animais em dieta completa. Por este motivo,

QUADRO II

Ação da sulfadiazina sobre a toxoplasmose experimental de camundongo (cálculo da dose média efetiva em condições de carência da dieta para ácido fólico e PABA)

- Grupos de 10 camundongos (fêmeas)
- Administração da droga por via subcutânea cada 6 horas durante 14 dias
- Inóculo: 20.000 toxoplasmas por via intraperitoneal

Grupo	Tratamento	Dose diária (mg/kg de peso)	Peso médio em g de peso	Porcentagem de camundongos sobreviventes nos dias								
				4º	7º	10º	12º	14º	21º	28º	35º	42º
I	Sulfadiazina	10	21,6	100	70	50	30	30	10	—	—	—
II	Sulfadiazina	20	21,8	100	100	90	80	70	60	40	30	30
III	Sulfadiazina	40	21,7	100	100	100	90	90	90	90	90	90
IV	Sulfadiazina	80	21,8	100	100	100	100	100	100	100	100	100
V	Nenhum (contrôle)	—	20,9	100	40	—	—	—	—	—	—	—

DME = 10 mg/kg peso/dia.

preferimos empregar, nas experiências de associação com o aminonucleosídeo, a sulfadiazina via subcutânea, adotando igualmente dieta carente em PABA e ácido fólico, para os animais em experiência.

II — Determinação da DME do aminonucleosídeo da Estilomicina.

Para a associação com a sulfadiazina foi necessário estabelecer, previamente, a DME do aminonucleosídeo para o tratamento de camundongos mantidos em dieta carente em PABA e ácido fólico. No Quadro III acham-se os resultados desta experiência, ficando determinada a DME como sendo de 27,5 mg/kg de peso/dia. Embora nossos resultados não tenham permitido determinações exatas das DME do aminonucleosídeo e da sulfadiazina, foram suficientes para atender seu objetivo precípuo, ou seja, o de

determinar doses que permitissem sobrevivência parcial dos camundongos tratados, nos dias considerados, para serem utilizados na experiência de associação.

III — Associação do aminonucleosídeo da Estilomicina com a sulfadiazina na toxoplasmose experimental de camundongo.

No Quadro IV acham-se reproduzidos os resultados obtidos na experiência de associação do aminonucleosídeo com a sulfadiazina, administrados subcutaneamente a camundongos mantidos em dieta carente em PABA e ácido fólico.

As doses das drogas foram calculadas tomando-se como DME, respectivamente, 27,5 mg/kg/dia para o aminonucleosídeo e 10 mg/kg/dia para a sulfadiazina (ver Quadros II e III).

QUADRO III

Ação do aminonucleosídeo sobre a toxoplasmose experimental de camundongo (cálculo da dose efetiva média [DME])

- Grupos de 10 camundongos (fêmeas)
- Tratamento com injeções subcutâneas cada 6 horas, durante 14 dias
- Dieta carente em PABA e ácido fólico
- Inóculo: 20.000 toxoplasmas

Grupo	Tratamento	Dose diária (mg/kg de peso)	Peso médio do grupo (g)	Porcentagem de camundongos sobreviventes nos dias					Sobrevida média (dias)	
				4º	7º	10º	12º	14º		21º
I	Aminonucleosídeo	5	21,1	100	10	—	—	—	—	6,7
II	Aminonucleosídeo	10	21,0	100	30	—	—	—	—	6,9
III	Aminonucleosídeo	20	21,0	100	90	30	10	10	—	9,5
IV	Aminonucleosídeo	40	21,4	100	100	90	80	60	—	15,6
V	Nenhum (contrôle)	—	21,0	100	40	—	—	—	—	7,0

DME = 27,5 mg/kg peso/dia.

QUADRO IV

Tratamento da toxoplasmose experimental de camundongo por associação de sulfadiazina e aminonucleosídeo por via subcutânea durante 14 dias cada 6 horas.

- DME empregada para sulfadiazina (10 dias) = 10 mg/kg/dia
- DME empregada para aminonucleosídeo (10 dias) = 27,5 mg/kg/dia
- Dieta balanceada carente em ácido fólico e PABA
- Inóculo: 20.000 toxoplasmas por via intraperitoneal

Grupo	Nº de animais	Peso médio do grupo (g)	Doses (mg/kg/dia)		Porcentagem de camundongos sobreviventes nos dias							Sobrevida média (dias)	
			Amino-nucleosídeo	Sulfa	4º	7º	10º	12º	14º	18º	21º		
I	10	18,3	27,5	10,0	100	100	100	100	100	70	20	—	16,3
II	10	18,1	27,5	5,0	100	100	100	100	80	50	10	—	15,1
III	9	18,1	27,5	2,5	100	77	77	66	66	22	—	—	12,1
IV	10	18,2	27,5	—	100	100	70	60	40	40	10	—	13,9
V	10	18,4	13,2	10,0	100	90	60	40	20	20	10	—	11,6
VI	10	18,2	13,2	5,0	100	80	20	10	—	—	—	—	9,4
VII	10	18,2	13,2	2,5	100	50	—	—	—	—	—	—	7,7
VIII	9	18,1	13,2	—	100	55	11	—	—	—	—	—	8,3
IX	10	18,2	6,6	10,0	100	80	40	10	10	10	—	—	9,6
X	10	18,5	6,6	5,0	100	40	—	—	—	—	—	—	7,5
XI	10	18,3	6,6	2,5	100	70	10	—	—	—	—	—	8,1
XII	9	18,5	6,6	—	100	45	—	—	—	—	—	—	7,7
XIII	10	18,4	—	10,0	100	60	30	10	10	—	—	—	8,9
XIV	10	18,2	—	5,0	100	30	—	—	—	—	—	—	6,9
XV	10	18,4	—	2,5	100	20	—	—	—	—	—	—	6,7
XVI	9	18,5	—	—	100	11	—	—	—	—	—	—	6,3

Na experiência obteve-se, em alguns níveis de associação, um efeito aditivo dos resultados quimioterápicos, mas a irregularidade observada nas diferentes combinações impediu-nos de analisar êsse efeito aditivo em termos quantitativos.

DISCUSSÃO

Como o objetivo principal do presente trabalho foi de estudar o efeito de associação de uma sulfonamida com o aminonucleosídeo da Estilomicina não quisemos utilizar a sulfadiazina por via oral, como tem sido feito pelos autores em geral, na toxoplasmose experimental. A variação individual de ingestão de dieta pelos animais não permite avaliar com precisão as doses ministradas, além da anorexia apresentada pelos camundongos no decorrer da infecção falsear a comparação dos resultados em diferentes níveis da droga. Utilizamos, em vista disto, a via subcutânea, estabelecendo o intervalo de 6 horas entre as injeções após determinarmos a curva de concentração sanguínea da sulfadiazina.

Desde que no esquema de associação planejamos utilizar frações da DME e que correspondiam a doses muito baixas de sulfadiazina, lembramos a possibilidade de o PABA e o ácido fólico habitualmente existentes na dieta completa balanceada reverterem o efeito da sulfonamida, prejudicando assim a comparação de efeito de diferentes níveis da droga, possibilidade esta reforçada pela demonstração de SUMMERS¹⁵ e FRENKEL & HITCHINGS⁷ de que dietas enriquecidas em PABA e ácido fólico foram capazes de reverterem o efeito da sulfonamida. Por êste motivo resolvemos utilizar a dieta carente em PABA e ácido fólico. E como se pode deduzir dos resultados expressos no Quadro I, em que os camundongos mantidos em dieta carente apresentaram, em média, sobrevida maior que os mantidos em dieta completa, parece mesmo que dietas preparadas com produtos complexos de origem animal e vegetal, como é o caso da dieta completa balanceada habitualmente empregada, contém níveis dessas vitaminas capazes de alterar os resultados do tratamento da toxoplasmose pelas sulfonamidas.

Para a efetivação das experiências de associação determinamos as doses médias efetivas do aminonucleosídeo e da sulfadiazina, mas, como se pode notar, os nossos resultados não permitiram a sua determinação precisa pelo método gráfico de LITCHFIELD & WILCOSON^{apud 2}. Para os nossos fins, no entanto, as DME obtidas foram satisfatórias, desde que para nós apenas interessava a determinação de doses que permitissem a sobrevida parcial dos camundongos tratados, num período de tempo determinado.

Nas experiências de associação obtivemos uma adição de efeitos quimioterápicos em alguns dos níveis de associação tentados, embora não houvesse a constância necessária dêste efeito para a sua demonstração quantitativa.

Se considerarmos que a sulfadiazina interfere indiretamente com a síntese "de novo" dos purino-nucleotídios e que o aminonucleosídeo, como análogo de purina, age provavelmente no processo de síntese "de salvação" ou na interconversão de nucleotídios purínicos, poderíamos esperar, na presente associação, um efeito sinérgico, pela atuação em vias convergentes de biossíntese (LACEY¹¹).

O efeito aditivo observado em nossa experiência ocorre em grande parte das associações de drogas e nada informa quanto a seu mecanismo de ação.

SUMMARY

Association of stylomycin aminonucleoside with sulfadiazine in experimental toxoplasmosis of mice.

Aiming to study the aminonucleoside of stylomycin association with sulfadiazine in experimental toxoplasmosis of mice, the authors establish first of all the median effective dosage (MED) of each drug, performing subcutaneous injections every six hours in animals kept in a diet lacking folic acid, p-aminobenzoic acid and vitamina B₁₂.

They verify that the MED of sulfadiazine in such conditions is about 1/5 of the MED of the same drug administered *per os* to animals kept in a balanced diet.

Concerning the association of drugs, they obtain, in some given levels, addictive effects concerning survival of treated animals, but they cannot demonstrate this effect in quantitative terms, for some variations in other levels have been observed.

REFERÊNCIAS

1. CHRISTEN, R. & THIERMANN, I. E. — Quimioterapia experimental de la toxoplasmosis. II. Efecto de la acromicina sobre la toxoplasmosis experimental del ratón. Bol. Inform. parasit. chil. 8:49-51, 1953.
2. EYLES, D. E. & COLEMAN, N. — Sinergistic effect of sulfadiazine and Daraprin against experimental toxoplasmosis in the mouse. Antibiot. & Chemother. 3:483-490, 1953.
3. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. I. Precursors of purine compounds. Exper. Parasitol. 7:224-235, 1958.
4. FERNANDES, J. F. & CASTELLANI, O. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. II. "In vitro" effect of tioguanine and aminonucleoside of Stylo-mycin. Exper. Parasitol. 8:480-485, 1959.
5. FERNANDES, J. F.; PEREIRA, J. P. M. & SILVA, L. H. P. — Nucleotide and polynucleotide synthesis in *Trypanosoma cruzi*. IV. Effect of the aminonucleoside of Stylo-mycin on mouse infection. Exper. Parasitol. 8:496-501, 1959.
6. FISTER, H. — Manual of standardizing procedures for spectrophotometric chemistry. Standard Scient. Supply Corp., 1950.
7. FRENKEL, J. K. & HITCHINGS, G. H. — Relative reversal by vitamins (p-aminobenzoic acid, folic and folinic acids) of the effects of sulfadiazine and pyrimethamine on *Toxoplasma*, mouse and man. Antibiot. & Chemother. 7:630-638, 1957.
8. GOLDTHWAIT, D. A.; PEABODY, R. A. & GREENBERG, G. — The biosynthesis of the purine ring. (In McELROY, W. D. & GLASS, B., ed. — Amino acids metabolism. Baltimore, Johns Hopkins Press, 1955. p. 765-781.)
9. HEWITT, R. I.; GUMBLE, A. R.; WALLACE, W. S. & WILLIAMS, J. H. — Experimental chemotherapy of trypanosomiasis. IV. Reversal by purines of the "in vivo" activity of Puromycin and an aminonucleoside analog, against *Trypanosoma equiperdum*. Antibiot. & Chemother. 4:1222-1227, 1954.
10. HUTCHINGS, B. L. — Puromycin. (In WOLSTENHOLME, G. E. W. & O'CONNOR, C. M., ed. — The chemistry and biology of purines. Ciba Foundation Symposium, p. 177-188. London, Churchill, 1957.)
11. LACEY, B. W. — Mechanisms of chemotherapeutic synergy. (In Strategy of chemotherapy, Eighth Symposium of the Society for General Microbiology, p. 247-287, Cambridge, University Press, 1958.)
12. SILVA, L. H. P. — "In vitro" effect of the aminonucleoside of Stylo-mycin and dimethyl-adenine against *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:155-162, 1960.
13. SILVA, L. H. P. & CAMARGO, E. P. — Ação de alguns análogos de purina, particularmente o aminonucleosídeo da estilomicina, na toxoplasmose experimental de camundongo. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 3:121-126, 1961.
14. SKIPPER, H. E. & BENNET Jr., L. L. — Biochemistry of cancer. Ann. Rev. Biochem. 27:137-166, 1958.
15. SUMMERS, W. A. — The effects of oral administration of aureomycin, sulfathiazole, sulfamerazine and 4,4'-diamino-diphenil sulfone on toxoplasmosis in mice. Am. J. trop. Med. 29:889-893, 1949.

Recebido para publicação em 18 julho 1961.