

AÇÃO DE ALGUNS ANÁLOGOS DE PURINA, EM PARTICULAR O AMINONUCLEOSÍDIO DA ESTILOMICINA, SOBRE A TOXOPLASMOSE EXPERIMENTAL DO CAMUNDONGO

L. H. Pereira da SILVA e E. Plessmann CAMARGO

RESUMO

Entre vários análogos de purina, a saber, N-6-dimetiladenina, tioguanina, isoguanina, 6-mercaptapurina, 2-mercaptapurina, azaguanina, 2-6-diaminopurina, N-6-dietil-9(3'-deoxi-3'-amino- β -D-ribofuranosil) purina e cinetina, bem como a Estilomicina e seu aminonucleosídeo, este último foi o que apresentou maior atividade contra a toxoplasmose experimental de camundongo. Comparando a Estilomicina, seu aminonucleosídeo e sua base purínica (dimetiladenina) em doses equimoleculares, os autores verificaram ser o aminonucleosídeo mais ativo. Estudaram o efeito desse análogo na sobrevida de camundongos infectados, conseguindo aumento da ordem de três vezes em relação aos controles.

INTRODUÇÃO

CHRISTEN & THIERMAN¹ e EYLES & COLEMAN³ mostraram que a Estilomicina é ativa contra o *Toxoplasma* nas infecções experimentais de camundongo, determinando aumento da sobrevida dos animais inoculados.

Os resultados obtidos em cultura de tecido por um de nós (SILVA⁵) com as frações aminonucleosídeo e dimetiladenina do antibiótico mostraram serem elas provavelmente responsáveis pela ação antitoxoplásmica da Estilomicina e levaram-nos a usá-las em infecções experimentais de camundongo pelo *Toxoplasma*. Desde que o aminonucleosídeo e a dimetiladenina são análogos de purina e COOK² demonstrara também certa ação inibidora da adenina e da 2-6-diaminopurina sobre a reprodução do *Toxoplasma* em cultura de tecido, resolvemos utilizar outros análogos de purina, a fim de verificar se algum deles apresentava valor quimioterápico.

MATERIAL E MÉTODOS

Camundongos. — Nas experiências foram usados camundongos albinos adultos da cria-

ção da Faculdade de Medicina, com cerca de 20 g de peso; em cada experiência foram empregados camundongos de um só sexo. Depois de pesados e marcados individualmente, os animais eram distribuídos em grupos de 6 ou 10.

A dieta fornecida *ad libitum* em forma de farinha seca continha: fubá — 46,5%, farinha de aveia — 15%, farinha de carne a 60% — 15%, caseína malha 30 — 15%, torta de amendoim — 3%, óleo de amendoim — 2%, farinha de osso — 1%, levedo de cerveja — 2%, sal de cozinha — 0,5%.

Toxoplasma. — Foi usada a cêpa "N" de *Toxoplasma gondii* obtida originalmente por NOBREGA *et al.*⁴ e mantida no Departamento de Parasitologia há 3 anos por repiques sucessivos em camundongos albinos.

Nas experiências utilizou-se para infectar os animais suspensão em salina de exsudato peritoneal de camundongo no 3.º dia de infecção. Após a colheita de material, este era deixado sedimentar por alguns minutos,

decantando-se em seguida o sobrenadante e procedendo-se a contagem no mesmo do número de toxoplasmas com câmara hematológica de Neubauer. Fazia-se em seguida a correção do volume em salina estéril, inoculando-se 0,5 ml de suspensão intraperitonealmente em cada camundongo. O número de toxoplasmas inoculados por camundongo variou de 20 a 200 mil, conforme a experiência. O tempo de colheita, contagem e inoculação nunca excedeu em conjunto uma hora.

Tratamento. — O tratamento foi iniciado de uma a três horas a partir da infecção. Utilizou-se sempre injeções por via subcutânea de soluções das drogas em salina, esterilizadas por filtração em filtro Seitz, em esquemas de 6 ou 8 horas de intervalo entre as injeções.

As drogas empregadas e suas respectivas proveniências foram as seguintes:

N-6-dietilamino-9-(3'-deoxi-3'-amino- β -D-ribofuranosil) purina, aminonucleosídeo da Estilomicina e Estilomicina — Lederle Lab. Div., American Cyanamid Co.

Dimetiladenina — preparada a partir do aminonucleosídeo, solubilizado em HCl 1 N, aquecido em banho-maria em ebulição durante uma hora e neutralizado com HONa 1 N.

Cinetina — Sigma Chemical Co.

2-Mercaptopurina, Azaguanina, Isoguanina, 2-6-diaminopurina — California Foundation for Medical Research.

Azaserina, Tioguanina, 6-Mercaptopurina — Dr. G. A. LePage (Stanford University, California).

QUADRO I

Ação de alguns análogos de purina e da azaserina sobre a toxoplasmose de camundongo.

- Grupos de 6 camundongos.
- Tratamento com 3 injeções subcutâneas, diárias, durante 4 dias.
- Inóculo: 200.000 toxoplasmas, por via intraperitoneal.

Droga	Dose diária (mg/kg de peso)	Mortos nos dias						Média de sobrevivida (em dias)
		3º	4º	5º	6º	7º	8º	
Tioguanina	3	—	2	2	2	—	—	5,0
6-mercaptopurina	30	1	1	3	—	—	1	5,0
2-mercaptopurina	30	—	2	4	—	—	—	4,7
Azaguanina	75	—	4	2	—	—	—	4,3
Isoguanina	30	—	3	3	—	—	—	4,5
2-6-diaminopurina	40	—	3	1	2	—	—	5,0
Aminonucleosídeo da Estilomicina	25	—	—	2	1	2	1	6,3
N-6-dietil-amino-9(3'-deoxi-3'-amino- β -D-ribofuranosil) purina	26	1	1	2	1	1	—	5,0
N-6-dimetil-amino-purina	14	—	2	4	—	—	—	4,7
Cinetina (furfuril-amino-purina)	20	—	—	2	4	—	—	5,6
Azaserina	3	—	2	2	2	—	—	5,0
Contrôle	—	1	2	3	—	—	—	4,3

Todos os análogos nos foram fornecidos pelo Dr. J. F. Fernandes (Lab. Fisiologia Celular, Fac. Medicina da Univ. São Paulo).

RESULTADOS

1. *Triagem de antipurínicos ativos contra o Toxoplasma.* — No Quadro I acham-se resumidos os resultados de experiência preliminar para verificar a ação de alguns análogos de purina e da azaserina na toxoplasmose experimental do camundongo.

O tratamento com três injeções diárias, nas doses indicadas para os diversos análogos, foi prolongado por quatro dias, interrompendo-se quando morreu a metade dos controles.

Como se pode ver, nenhuma das drogas, nas concentrações testadas, apresentou ação apreciável sobre a evolução da infecção. Entretanto, o aminonucleosídeo da Estilomicina e, em menor grau, a cinetina, determinaram certo prolongamento da sobrevida dos animais inoculados. Esta ação, avaliada pela observação dos animais, ainda foi mais nítida, porque o estado geral dos mesmos manteve-se bom até o 4.º dia, quando os controles achavam-se mortos ou moribundos.

Embora nesta primeira experiência a N-6-dimetilaminopurina (dimetiladenina) não se tivesse mostrado ativa, em virtude da analogia estrutural com a Estilomicina e dos ótimos resultados obtidos em cultura de tecido (SILVA⁵), realizamos nova exploração, diminuindo o inóculo e aumentando a dose da droga. Empregando doses equimoleculares de Estilomicina, aminonucleosídeo e dimetiladenina, obtivemos os resultados que se acham expressos no Quadro II.

Nesta experiência, como se vê, a dimetiladenina revelou ação, embora menos pronunciada que a do aminonucleosídeo. Este, por sua vez, mostrou-se mais ativo que o antibiótico inteiro.

2. *Ação do aminonucleosídeo da Estilomicina sobre a toxoplasmose experimental de camundongo.* — O aminonucleosídeo, tendo-se revelado mais ativo que todos os outros antipurínicos testados, foi estudado com al-

gum detalhe no sentido de se estabelecerem as doses que permitissem a sobrevida máxima.

No Quadro III acham-se resumidos os resultados de uma das experiências realizadas com êsse objetivo.

Como se vê no Quadro III, obteve-se uma triplicação da sobrevida média em relação aos controles e 20% de sobrevida aos 30 dias, quando a dose empregada ascendeu a 60 mg/kg/dia. Os camundongos sobreviventes não estavam, entretanto, curados, pois a inoculação de triturado de cérebro dos mesmos determinou infecções agudas em outros camundongos, com demonstração de parasitos.

Na dose de 80 mg/kg/dia notaram-se manifestações tóxicas nítidas a partir do 7.º dia e os camundongos morreram precocemente.

DISCUSSÃO

Nossos resultados confirmam os dados obtidos por um de nós (SILVA⁵) em cultura de tecido quanto à responsabilidade de fração aminonucleosídeo pela ação antitoxoplásmica da Estilomicina. Deve-se assinalar, entretanto, que a droga apresentou ação muito mais intensa em cultura de tecido do que nas infecções experimentais. Nestas não se conseguiu cura da infecção, enquanto nas culturas de tecido pode-se obter eliminação total dos toxoplasmas. É possível que a menor ação do aminonucleosídeo no animal decorra de uma inativação da droga por nucleosídeos dos tecidos, com liberação da base purínica, dimetiladenina, de atividade menor.

Apesar dos resultados de pouco valor quimioterápico obtidos com o aminonucleosídeo, e do resultado negativo dos outros análogos de purina testados, acreditamos que novos análogos devam ser experimentados contra o *Toxoplasma*. Como já foi assinalado (SILVA⁵), seria de grande interesse a utilização de antipurínicos com as drogas atualmente conhecidas ativas contra o *Toxoplasma*, a saber, sulfonamidas e piremetamina, desde que tal associação poderia agir sobre vias metabólicas convergentes do parasito.

QUADRO II

Comparação da ação da Estilomicina, seu aminonucleosídeo e sua base purínica (dimetiladenina) na toxoplasmose experimental de camundongo.

- Grupos de 10 camundongos.
- Tratamento durante 7 dias, cada 8 horas por via subcutânea.
- Inóculo: 50.000 toxoplasmas por via intraperitoneal.

Grupo	Tratamento	Dose diária (mg/kg de pêso)	Pêso médio do grupo (g)	Porcentagem de camundongos sobreviventes nos dias:						Sobrevida média (dias)
				4º	7º	10º	12º	14º	21º	
I	Estilomicina	70	24,0	100	70	70	10	—	—	10,3
II	Aminonucleosídeo	38	25,0	100	100	90	60	30	—	13,7
III	Dimetiladenina	21	25,5	100	50	30	10	—	—	8,4
IV	Nenhum (contrôle)	—	25,0	100	20	—	—	—	—	6,2

QUADRO III

Ação do aminonucleosídeo sobre a toxoplasmose experimental de camundongo. Cálculo da dose efetiva média (DME).

- Grupo de 10 camundongos (fêmeas).
- Tratamento com injeções subcutâneas cada 8 horas, durante 14 dias.
- Dieta completa balanceada.
- Inóculo: 20.000 toxoplasmas por via intraperitoneal.

Grupo	Tratamento	Dose diária (mg/kg de pêso)	Pêso médio do grupo (g)	Porcentagem de camundongos sobreviventes nos dias								Sobrevida média (dias)
				4º	7º	10º	12º	14º	21º	28º	30º	
I	Aminonucleosídeo	20	21,0	100	100	80	70	40	—	—	—	12,6
II	"	40	21,8	100	100	100	90	90	40	10	10*	20,6**
III	"	60	20,7	100	100	90	90	80	40	30	20*	18,5**
IV	"	80	20,1	100	90	10	—	—	—	—	—	8,8
V	Nenhum (contrôle)	—	21,6	100	20	—	—	—	—	—	—	6,8
VI	Contrôles sem toxoplasmas	—	21,4	100	100	100	100	100	100	100	100	—

* Os triturados de cérebro foram infectantes para camundongos limpos.

** Sem considerar os sobreviventes do 30º dia.

SILVA, L. H. P. & CAMARGO, E. P. — Ação de alguns análogos de purina, em particular o aminonucleosídeo da Esfionmicha, sobre a toxoplasmose experimental do camundongo. Rev. Inst. Méd. trop. São Paulo 121-126, 1961.

SUMMARY

Action of some purine analogs, especially the aminonucleoside of Stylomycin, in experimental toxoplasmosis of mice.

The following purine analogs were tested against *Toxoplasma* in experimental infection of mouse: N-6-dimethyladenine, tioguanine, isoguanine, 6-mercaptapurine, 2-mercaptapurine, azaguanine, 2-6-diamino-purine, N-6-diethylamino-9-(3'-deoxy-3'-amino- β -D-ribofuranosil) purine and cinctine, as well as the antibiotic Stylomycin and its aminonucleoside fraction. The aminonucleoside showed more activity when compared with the whole antibiotic and to dimethyladenine in equal molar dosis; the period of survival of treated animals was three times longer than that of controls.

REFERÊNCIAS

1. CHRISTEN, A. 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. COOK, M. K. — The inhibitory effect of adenine and related compounds on the proliferation of *Toxoplasma gondii* in tissue culture. J. Parasitol. 44:274-279, 1958.
3. EYLES, D. E. & COLEMAN, N. — The anti-toxoplasmic activity of puromycin. Antibiot. & Chemother. 4:649-652, 1959.
4. NOBREGA, P.; TRAPP, E. E. & GIOVANNONI, M. — Toxoplasmose epizootica em coelhos: ação da sulfadiazina. Ciênc. & Cult. 4:134-135, 1952.
5. SILVA, L. H. P. da — "In vitro" effect of the aminonucleoside of Stylomycin and dimethyl-adenine against *Toxoplasma gondii*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo 2:155-162, 1960.

Recebido para publicação em 8 maio 1961.