

ESTUDOS TERAPÊUTICOS EM COBAIAS EXPERIMENTALMENTE INOCULADAS COM *LEISHMANIA ENRIETTII*

Z. BRENER

RESUMO

É descrita uma técnica que permite estudar quantitativamente a resposta terapêutica de cobaias experimentalmente inoculadas com *Leishmania enriettii*. Esfregaços por aposição são feitos com material colhido por biopsia de lesões das orelhas sendo determinada a relação entre o número de leishmânias e o número de células de todos os tipos em animais tratados e contrôles. Experiências realizadas com o estibogluconato de sódio (Pentostam) antimoniato de N-metil-glucamina (Glucantime), antimônio-pirocatecol-dissulfonato de sódio (Fuadina) e uma diamidina aromática (Propamidina) permitiram demonstrar nítidas diferenças entre o número de leishmânias nos animais tratados e nos contrôles, assim como uma relação entre a dose usada e a redução do número de parasitas. Ao lado disso, a regressão das lesões se constitui em mais um elemento para avaliação da atividade de drogas.

INTRODUÇÃO

Os estudos de ADLER & TCHERNOMORETZ^{1, 2, 3} com a *L. donovani* demonstraram a possibilidade de uma técnica quantitativa na terapêutica experimental da leishmaniose através da relação entre o número de leishmânias e o número de núcleos de células em esfregaços de órgãos infectados. FULTON⁷ usou essa relação, obtida em esfregaços de baço, como índice de infecção em animais. Coube, entretanto, a GOODWIN^{8, 9} a standardização dessa técnica em *Cricetus auratus* experimentalmente inoculados com *L. donovani*. Em dois trabalhos sucessivos aquele autor investigou os aspectos quantitativos da relação leishmânias/núcleos em esfregaços de material colhido do baço por biopsia operatória, estudando a variabilidade e a reprodutibilidade dos dados, concluindo que o número de parasitas por 100 núcleos de células esplênicas de todos os tipos pode funcionar como um método para a determinação do grau de infecção em "hamsters". Tratando animais com solustibosan observou GOODWIN⁹ que existe uma relação linear en-

tre o logaritmo da dose e o logaritmo da razão entre a contagem de parasitas em esfregaços obtidos antes e após o tratamento. Mais recentemente FRANCHINO, GRUND & STAUBER⁶ e STAUBER, FRANCHINO & GRUND¹¹ descreveram um método de "screening" de drogas em *Mesocricetus auratus* experimentalmente infectados por *L. donovani* que é baseado na reprodutibilidade de infecções obtidas por inoculações intracardíacas e no qual foi determinada a relação entre leishmânias e núcleos em esfregaços de fígado. Empregando drogas leishmanicidas demonstraram aqueles autores que havia uma nítida relação entre a dose da droga e a redução do número de parasitas.

No presente trabalho apresentaremos os resultados obtidos na terapêutica experimental de cobaias inoculadas com *L. enriettii* empregando uma técnica quantitativa baseada na relação entre o número de leishmânias e o número de núcleos celulares, sendo estudada a resposta terapêutica de animais infectados tratados com algumas drogas ativas.

MATERIAL E MÉTODOS

Inoculação dos animais — O material infectante provém de cobaias inoculadas há 20-30 dias, apresentando lesões do focinho sem ulcerações superficiais. A superfície do focinho é cuidadosamente depilada e o granuloma, geralmente de forma nodular, é retirado inteiramente, colhendo-se o material do mesmo, já que a inoculação de homogeneizados contendo pele dá origem a uma alta percentagem de infecções bacterianas. O fragmento de tecido assim obtido é colocado em um "tissue grinder" de vidro e homogeneizado com sêro fisiológico contendo penicilina (150 U.I./ml) e estreptomicina (150 meg/ml) para prevenir contaminações bacterianas. Cerca de 200-250 mg de tecido contendo leishmânias podem ser usados para a infecção de 20-25 animais.

Os animais são inoculados na pele do focinho com 0,10 ml da suspensão e em diferentes pontos das orelhas com 0,05 ml.

Evolução das lesões — Após 8-10 dias as lesões podem ser percebidas macroscopicamente sob a forma de infiltrados que espessam as regiões inoculadas. Nas orelhas as lesões podem ser percebidas pelo tato ou por

transparência como áreas de maior densidade. As lesões atingem o seu máximo entre os 30 e 40 dias de evolução. A totalidade dos animais inoculados se infecta e a cura espontânea é muito rara.

Biopsia das lesões e contagem das leishmânias — Um fragmento circular da orelha é obtido, no ponto correspondente à inoculação, com o auxílio de um furador de rólhas habitualmente usado nos laboratórios. O fragmento é cortado ao meio por uma secção transversal, fazendo-se então esfregaços por aposição com a superfície cruenta do tecido, tendo-se o cuidado prévio de retirar o excesso de sangue por meio de papel de filtro. As lâminas são coradas pelo método May-Grünwald-Giemsa. Como acentua GOODWIN⁸, as áreas mais espessas da preparação por contato não favorecem a contagem e devem ser evitadas. Na prática, GOODWIN recomenda o seguinte artifício que é por nós usado com pequenas variações: focaliza-se a preparação com aumento médio, localiza-se uma área menos espessa com núcleos mais esparsos e somente então usa-se o aumento forte para a focalização das leishmânias (Fig. 1). Para facilitar a contagem, colocamos, dentro da ocular do microscópio, um pequeno disco reticulado ("Netzmikrometer Zeiss").

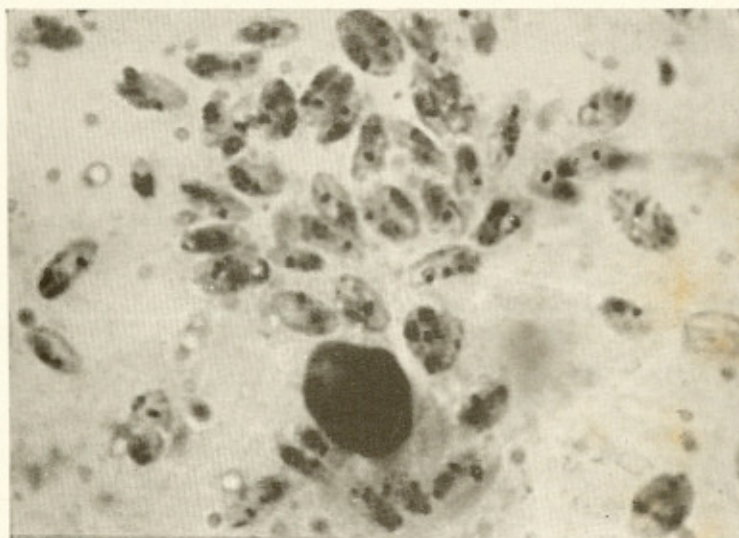


Fig. 1 — "*L. enriettii*" em esfregaço por aposição de lesão de orelha de cobaia experimentalmente infectada ($\times 1.000$).

RESULTADOS

Número de núcleos a ser contado — A reprodução intensa e rápida da *L. enriettii*, sobretudo em animais não tratados, torna às vezes os parasitas extremamente numerosos no esfregaço, tornando trabalhosa a sua contagem. A fim de, como fez GOODWIN⁸, determinar-se o grau de variação apresentado nas contagens, foi feito um estudo da variação obtida em contagens, realizadas em uma mesma lâmina, em 10 séries sucessivas de 50 e 100 núcleos, em material colhido de uma cobaia com 10 dias de evolução da infecção (Quadro I). A determinação do coeficiente de variação, que expressa, através do desvio padrão, a variação em termos de porcentagem, mostra que a diminuição da variação pela contagem de 100 núcleos em vez de 50 é pequena e provavelmente não afeta sensivelmente os resultados finais. Entretanto, na prática, 100 ou mais núcleos podem ser contados se se deseja tornar ainda mais rigorosos os resultados.

QUADRO I

Varição obtida em contagens de leishmânias, realizadas em uma mesma lâmina, em 10 séries sucessivas de 50 e de 100 núcleos de células do esfregaço (Cobaia C.).

Ordem das séries	Nº de leishmânias contadas	
	por 50 núcleos	por 100 núcleos
1	194	717
2	319	649
3	383	720
4	295	703
5	313	553
6	341	854
7	249	605
8	302	607
9	346	695
10	304	657
Médias	304	676
Desvio padrão	52,6	83,2
Coef. de variação .	17,3%	12,1%

Experiências de terapêutica

1. A fim de se investigar a praticabilidade do método, 6 cobaias foram inoculadas no focinho e em 4 diferentes pontos das orelhas com uma suspensão de leishmânias obtida da maneira já descrita. No 10.º dia de infecção foi iniciada a administração, em 3 dos animais, de estibogluconato de sódio ("Pentostam") na dose de 0,5 ml/400 g (equivalentes a 50 mg de antimônio pentavalente), durante 8 dias consecutivos, por via intramuscular. Três animais foram tomados como controles. Biopsias das lesões, escolhidas sem seleção, foram feitas, nos animais controles e tratados, no 2.º, 4.º e 8.º dias de tratamento, sendo feitos esfregaços por aposição e contagem de leishmânias correspondentes a 200 núcleos de todos os tipos. Os resultados estão expressos na fig. 2 e mostram nítidas diferenças entre o número de leishmânias nos animais tratados e controles. Resultados idênticos foram obtidos com o antimoniató de N-metilglucamina ("Glucantime") usado na dose de 1,0 ml/500 g.

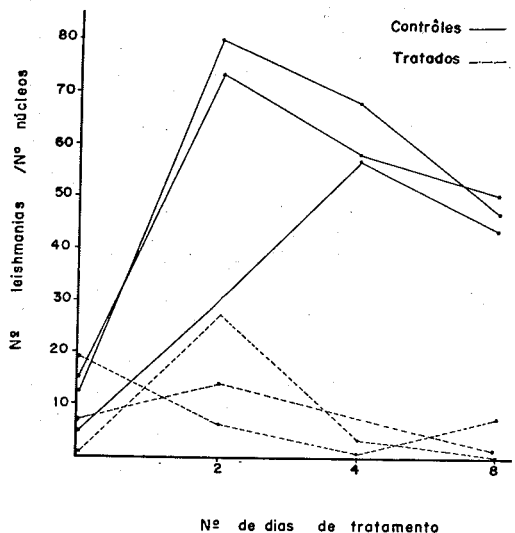


Fig. 2 — Relação nº de leishmânias/nº de núcleos, em animais tratados com estibogluconato de sódio (50 mg/400 g) e em animais controles. Início do tratamento no 10º dia após inoculação.

2. Considerando que, devido ao crescimento abundante do parasita, um número extremamente grande de parasitas está presente nas preparações obtidas em torno do 20.º dia de inoculação, dificultando a con-

tagem, decidimos iniciar a terapêutica no dia seguinte à inoculação, o que deveria, também, encurtar o período de observação.

Experiências com o antimoniato de N-metilglucamina: 16 cobaias foram inoculadas da maneira habitual no focinho e em dois pontos das orelhas, sendo então divididas em 4 grupos iguais. O antimoniato de N-metilglucamina foi administrado a 3 dos grupos nas doses respectivas de 0,25 ml/400 g, 0,50 ml/400 g e 1,0 ml/400 g (correspondentes a 75 mg, 150 mg e 300 mg da substância ativa), a partir do dia seguinte à inoculação, em 10 dias consecutivos, por via intramuscular; 4 animais foram tomados como contrôles. Biopsias das lesões das orelhas foram feitas no 4.º e 11.º dias de inoculação. Os resultados estão expressos na fig. 3 e demonstram a existência de uma nítida relação entre a dose e a redução do número de leishmânias.

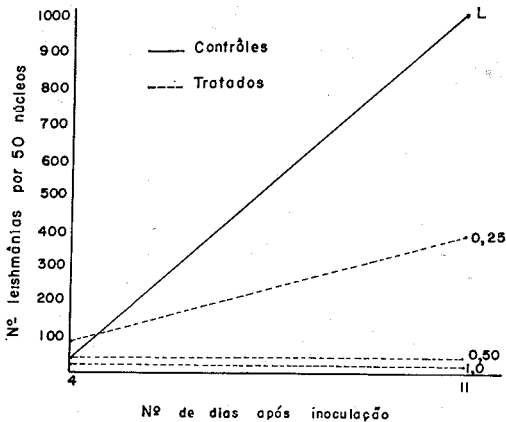


Fig. 3 — Número de leishmânias em cobaias tratadas pelo antimoniato de N-metilglucamina (75 mg, 150 mg e 300 mg por 400 g de peso) e em cobaias contrôles. Início do tratamento no dia seguinte à inoculação.

Experiências com o antimônio-pirocatecol-dissulfonato de sódio (Fuadina): 9 cobaias inoculadas do modo descrito foram separadas em 3 grupos iguais, sendo, em dois deles, administrada a Fuadina nas doses de 0,6 ml/400 g e 1,2 ml/400 g, em 10 doses diárias consecutivas, por via intramuscular, a partir do dia seguinte à inoculação. Biopsias foram feitas no 4.º e 11.º dias de inoculação. Os resultados estão expostos na fig. 4.

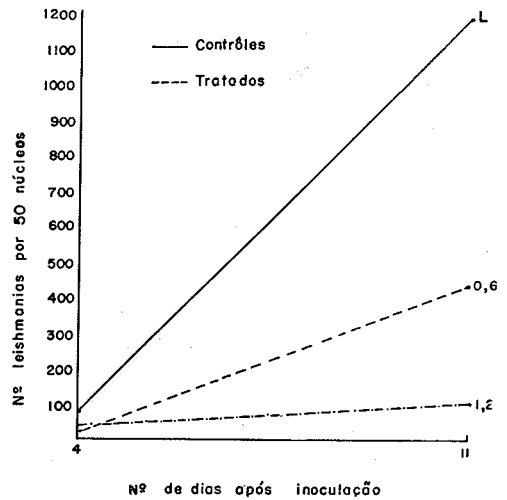


Fig. 4 — Número de leishmânias em cobaias tratadas pela Fuadina (0,6 ml e 1,2 ml por 400 g de peso) e em cobaias contrôles. Início do tratamento no dia seguinte à inoculação.

Experiências com diamidinas aromáticas: empregando-se a pentamidina foram observadas manifestações tóxicas, extremamente acentuadas mesmo em doses de 2 mg/kg, que impediram qualquer conclusão. Melhores resultados foram obtidos com a Propamidina que foi usada na dose de 1 mg/kg durante 10 dias consecutivos por via intramuscular, a partir do dia seguinte à inoculação. Os resultados, obtidos em 4 cobaias tratadas e 4 contrôles, estão expostos na fig. 5.

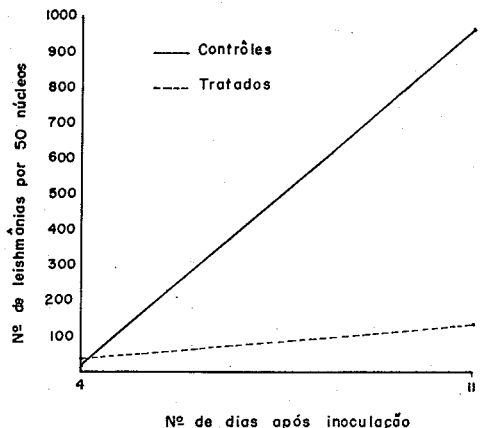


Fig. 5 — Número de leishmânias em animais tratados pela propamidina (1 mg/kg) e em cobaias contrôles. Início do tratamento no dia seguinte à inoculação.

3. Reprodutibilidade: além das séries referidas foram feitas ainda três outras a fim de se estudar a reprodutibilidade do método, empregando-se o antimoniato de N-metilglucamine na dose de 1,0 ml/400 g, durante 10 dias consecutivos, por via intramuscular, a partir do dia seguinte à inoculação; as biopsias foram feitas no 11.º dia após a inoculação. Os resultados estão expostos no quadro II e mostram a uniformidade dos resultados.

Ao lado disso, um estudo da variação do número de leishmânias em vários sítios de inoculação de cobaias tratadas e não tratadas foi feito mostrando que, apesar das variações naturais, existe uniformidade nas contagens em animais tratados e contróles.

4. Resposta clínica à terapêutica: diferenças nítidas na evolução das lesões podem ser melhor percebidas quando a medicação é iniciada em torno do 10.º dia da inocula-

QUADRO II

Relação nº de leishmânias/nº de núcleos em animais tratados pelo antimoniato de N-metilglucamine (1,0 ml/400 g, 10x) e animais contróles.

Nº	Experiência I		Experiência II		Experiência III	
	Tratados	Contróles	Tratados	Contróles	Tratados	Contróles
1	—	19,2	—	18,8	—	20,0
2	—	10,4	—	29,3	0,05	20,4
3	0,2	17,7	0,3	17,4	—	14,2
4	0,1	9,8	—	—	—	—
5	—	9,2	—	—	—	—



Fig. 6 — A) cobaia tratada pelo antimoniato de N-metilglucamina (1,0 ml/400 g, 10 doses a partir do 10º dia após inoculação) observada no 30º dia de inoculação. B) cobaia controle observada no 30º dia de inoculação.

ção; a regressão da lesão se faz em cerca de 10-12 dias de modo que entre 20-30 dias de evolução podem ser percebidas facilmente as diferenças entre os animais tratados e os controles (fig. 6). Diferenças idênticas podem ser percebidas se se faz a determinação da espessura das lesões nas orelhas.

DISCUSSÃO

MEDINA¹⁰ foi o primeiro autor a sugerir o uso da *L. enriettii* como elemento de prova dos medicamentos específicos; tendo empregado antimoniais trivalentes e uma diamidina concluiu aquele autor que as drogas foram ativas na leishmaniose da cobaia provocando regressão das lesões tumorais e amolecimento dos espessamentos provocados pelo parasita. COUTINHO⁴ comparou a ação de um antimonial trivalente (Fuadina) com um pentavalente (Solustibosan), concluindo ser a *L. enriettii* mais sensível aos compostos pentavalentes. Em outro trabalho COUTINHO⁵ ampliou as suas observações estudando a ação terapêutica de um antimonial pentavalente (Solustibosan), um antimonial trivalente (Fuadina), um composto arsenical (amino-arsenofenol) e uma diamidina aromática (Pentamidine), concluindo ser o composto antimonial o mais ativo, ao passo que a diamidina e o arsenical se revelaram ineficazes e muito tóxicos para a cobaia.

No presente trabalho são confirmados em linhas gerais os achados de MEDINA¹⁰ e COUTINHO^{4,5}, sendo também nossa impressão que a *L. enriettii* é mais sensível aos antimoniais pentavalentes. Apesar do crescimento abundante do parasita dificultar um "approach" quantitativo, é nossa impressão que a técnica aqui descrita permite detectar ações parciais de drogas eventualmente ativas. Sem sugerir que o uso da *L. enriettii* deva substituir as técnicas já bem estandardizadas de avaliação de atividade leishmanicida em "hamsters" experimentalmente inoculados pela *L. donovani*, achamos que testes empregando aquele parasita podem representar um elemento de grande utilidade em virtude de sua facilidade, rapidez e de, como foi dito, revelarem ações medicamentosas parciais. Recorde-se que nos testes com *L. donovani* as infecções não são homogêneas, em consequência da variabilidade da resposta do

hospedeiro, o que obriga a uma pré-seleção dos animais por meio de uma biopsia operatória do baço do animal infectado; uma desvantagem adicional consiste na eventual dificuldade de obtenção, pelo menos em nosso meio, de um número suficiente de "hamsters".

A exemplo do que ocorre em animais inoculados com *L. donovani*, dificilmente se consegue erradicar a infecção por *L. enriettii*, sendo freqüentes as recidivas. Apesar disso, a observação clínica evidencia diferenças extremas entre animais tratados por drogas ativas e os não tratados, constituindo essa observação mais um elemento para avaliação das drogas.

SUMMARY

Therapeutic essays on guinea-pigs experimentally infected with "Leishmania enriettii".

In guinea-pigs experimentally infected with *Leishmania enriettii* an estimate of the degree of infection can be obtained by examining contact smears of cut surface of ear lesions and by determining the ratio "number of leishmaniae number of cell nuclei". The reliability of the method was demonstrated by a study of the variance and reproductibility of the data. Tests performed with sodium stibogluconate, N-methylglucamine antimoniate, fouadin and dibromopropamide isothionate showed a marked and significant difference in the number of leishmaniae in treated and control animals. With sodium stibogluconate and fouadin a dose-response correlation was determined. Besides these data, the involution of the macroscopical lesions may also be used as an element for the assessment of drug activity.

REFERÊNCIAS

1. ADLER, S. & TCHERNOMORETZ, J. — The action of 4:4'diamidine stilbene on *Leishmania donovani* in the Syrian hamster, *Cricetus auratus*. Ann. trop. Med. Parasitol. 33:313-322, 1939.
2. ADLER, S. & TCHERNOMORETZ, J. — Notes on the action of 4:4'diamino stilbene on *Leishmania donovani* and *L. infantum* in the Syrian hamster, *Cricetus auratus*. Ann. trop. Med. Parasitol. 35:9-14, 1941.

3. ADLER, S. & TCHERNOMORETZ, J. — The action of some aromatic diamidines on infections of *Leishmania donovani* in the Syrian hamster, *Cricetus auratus*. Ann. trop. Med. Parasitol. 36:11-16, 1942.
4. COUTINHO, J. O. — Nota sobre o tratamento da leishmaniose da cobaia (*Leishmania enriettii* Muniz e Medina, 1948) por um antimonial pentavalente "Solustibosan". Folia clin. et biol. 17:151-156, 1951.
- 5 — COUTINHO, J. O. — Nota sobre o tratamento da leishmaniose da cobaia, *Leishmania enriettii* Muniz e Medina, 1948. Folia clin et biol., 23:37-42, 1955.
6. FRANCHINO, E. M.; GRUND, J. & STAUBER, L. A. — A method for screening compounds against visceral leishmaniasis in the hamster. J. Parasitol. 42 (section 2):22, 1956.
7. FULTON, J. D. — The therapeutic action of some newer aromatic diamidines on *Leishmania donovani* infections of golden hamsters (*Cricetus auratus*). Ann. trop. Med. Parasitol. 38:147, 1944.
8. GOODWIN, L. G. — The chemotherapy of experimental leishmaniasis. I. The spleen as an index of infection in the Syrian hamster. Trans. Roy. Soc. trop. Med. & Hyg., 38:151-160, 1944.
9. GOODWIN, L. G. — The chemotherapy of experimental leishmaniasis. II. A dose response curve for the activity of sodium stibogluconate. Trans. Roy. Soc. trop. Med. & Hyg., 39:133-145, 1945.
10. MEDINA, H. — Estudos sobre leishmaniose. III. A leishmaniose do cobaio como elemento de prova dos medicamentos específicos. Arq. Biol. Tecnol. 2:7-25, 1947.
11. STAUBER, L. A.; FRANCHINO, E. M. & GRUND, J. — An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. J. Protozool. 5:269-273, 1958.

Recebido para publicação em 10 março 1960.