

**POTENCIALIZAÇÃO DA ISONIAZIDA PELO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) NO TRATAMENTO DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*), EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS COM *Mycobacterium bovis* (AN5)**

Antonio Carlos Paes<sup>1</sup>  
José De Angelis Cortês<sup>1</sup>

**RESUMO**

A tuberculose zoonótica é uma doença mundialmente distribuída, com grande importância para a saúde pública, causada pela bactéria *Mycobacterium bovis*. Sua resistência a algumas drogas é muito discutida baseada no tratamento e diagnóstico. Assim, objetivou-se verificar o efeito potencializador do dimetilsulfóxido (DMSO) em relação a isoniazida. Três grupos de 20 hamsters foram inoculados experimentalmente com uma estirpe de *M.bovis*: G1, controle; G2, tratado com isoniazida durante 30 dias após a infecção; G3, com isoniazida associada com DMSO pelo mesmo período. Todos os grupos foram sacrificados ao final do experimento. À necropsia foram colhidos fígado, pulmão, baço e rim para realização de exames histopatológicos e avaliação da intensidade das lesões, análise morfológica de granulomas e exames microbiológicos para isolamento e quantificação do agente. O resultado dos exames histopatológicos mostrou menor intensidade das lesões e menor número de granulomas e da área ocupada pelos mesmos em fígado e pulmão dos animais do G3 em relação aos outros grupos. Ao exame microbiológico identificou-se no G3 uma diminuição na quantificação do agente, isolado dos órgãos com diferença significativa comparada ao G2. Deste modo, os resultados comprovaram a eficácia do DMSO em potencializar a ação terapêutica da isoniazida frente a uma estirpe patogênica de *M.bovis*, provavelmente pelo aumento da penetração nas lesões tuberculosas e na complexa parede celular do agente, contudo, não suficiente para a eliminação completa da infecção.

**Palavras-chave:** tuberculose, *Mycobacterium bovis*, *Mesocricetus auratus*, isoniazida, dimetilsulfóxido.

**POTENTIALIZATION OF ISONIAZIDE BY DIMETHYLSUPHOXIDE (DMSO) IN THE TREATMENT OF HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*), EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Mycobacterium bovis* (AN5).**

**ABSTRACT**

Zoonotic tuberculosis is a worldwide disease with a high importance to public health, caused by bacterium *Mycobacterium bovis*. Its resistance to some drugs is very discussed based in the treatment and diagnosis of *M.bovis*. Thus, we aimed to verify the potentiality effect of dimethylsulphoxide (DMSO) compared to isoniazide. Three groups of 20 hamsters each one were experimentally inoculated with a *M.bovis* strain: G1, control; G2, treated with isoniazide, during 30 days after the infection; G3, with isoniazide associated with DMSO, for the same period. All groups were sacrificed at the final of the experiment. At the necropsy, liver, lung, spleen and kidney of all the animals were collected for histopathological test, to evaluate the intensity of the lesions; morphometric analysis of granulomes; and microbiological tests to isolate and quantification of the agent. The histopathological results revealed lower intensity of the lesions, and lower number of granulomes and of the occupied

<sup>1</sup>Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –UNESP – Distrito de Rubião Junior, s/n, Botucatu – SP – Brasil ([paesacmi@fmvz.unesp.br](mailto:paesacmi@fmvz.unesp.br))

**Endereço para correspondência:**

Prof. Ass. Dr. Antônio Carlos Paes ([paesacmi@fmvz.unesp.br](mailto:paesacmi@fmvz.unesp.br))

Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia –UNESP – Distrito de Rubião Junior, s/n,18618-000 Botucatu – SP – Brasil

Fone: (14) 38116270 Fax: (14) 38116075

area for these one in liver and lung of animals of G3 than other groups. Microbiological test revealed a decrease in the quantity of the agent in studied organs, in G3, with statistical difference, compared to G2. Thus, the results confirmed the efficacy of DMSO to enhance the therapeutic action of isoniazide against a *M.bovis* pathogenic strain, probably by the increasing of its penetration into tuberculous lesions and by the complex cellular wall of the agent, however, not enough to the completely elimination of the infection.

**Key words:** tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, *Mesocricetus auratus*, isoniazide, dimethylsulphoxide.

### POTENCIALIZACIÓN DE LA ISONIAZIDA POR EL DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) EN EL TRATAMIENTO DE HAMSTERS (*Mesocricetus auratus*), EXPERIMENTALMENTE INFECTADOS CON *Mycobacterium bovis* (AN5).

#### RESUMEN

La tuberculosis zoonótica es una enfermedad mundial, con una gran importancia para la salud pública, causada por la bacteria *Mycobacterium bovis*. Su resistencia a algunas drogas muy se discute basada en el tratamiento y diagnóstico. Así, apuntamos verificar el efecto de la potencialidad del dimetilsulfóxido (DMSO) comparado a isoniazida. Tres grupos de 20 hamsters cada fueron inoculados experimentalmente con una estirpe de *M.bovis*: G1, control; G2, tratado con isoniazida durante 30 días después de la infección; G3, con isoniazida asociada con DMSO, para el mismo tiempo. Todos los grupos fueron sacrificados al final del experimento. En la necropsia fueron recogidos el hígado, pulmón, bazo y riñón para la realización de la prueba histopatológica para evaluar la intensidad de las lesiones, análisis morfométrica de los granulomas y pruebas microbiológicas para el aislamiento y cuantificación del agente. Los resultados histopatológicos revelaron una intensidad más reducida de las lesiones y un número más bajo de granulomas y de la area ocupada por estes en el hígado y pulmón de los animales del G3 en relación a los otros grupos. La prueba microbiológica reveló una disminución en la cantidad del agente en los organos estudiados en G3, con diferencia estadística comparada al G2. Así, los resultados confirmaron la eficacia del DMSO en potencializar la acción terapéutica de la isoniazida frente a una estirpe patogena de *M.bovis*, probablemente por el aumento de la penetración en las lesiones tuberculosas y de la compleja pared celular del agente, sin embargo, no suficiente para la eliminación completa de la infección.

**Palavras-clave:** tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, *Mesocricetus auratus*, isoniazida, dimetilsulfóxido.

#### INTRODUÇÃO

A tuberculose acompanha a espécie humana desde a mais remota antigüidade, sendo as lesões tuberculosas, pulmonares e vertebrais, descritas desde 400a.C (GRANGE, 1990).

A tuberculose bovina é uma doença transmissível, de natureza granulomatosa crônica e caráter progressivo, com tubérculos característicos que tem como agente etiológico específico o *Mycobacterium bovis*, e cujo aparecimento está estreitamente associado a múltiplos fatores condicionantes (BEER, 1981; JONES e HUNT, 1983; GRANGE, 1990; CORREA e CORREA, 1992; BLOOD e RADOSTITIS, 1994; NEILL et al., 1994).

A parede celular do *M.bovis* é composta por quatro camadas a partir da membrana celular: peptidoglicano, arabinogalactano, arabinose e galactose. Técnicas bioquímicas para a purificação de lipídios da parede celular permitiram o isolamento e identificação de glicolipídios contendo enxofre na molécula, denominados sulfolipídios ou sulfatidas, responsáveis pela sobrevivência do *M.bovis* virulento no interior de macrófagos pela inibição da formação do fagolisossomo evitando a exposição do agente às enzimas hidrolíticas presentes nos lisossomos (GRANGE, 1990).

As células que compõem o granuloma tuberculoso típico são os macrófagos, células epitelióides, macrófagos policariontes ou células gigantes de inflamação e linfócitos; sendo a célula

epitelióide o componente característico da reação granulomatosa (MARIANO, 1995).

Uma das primeiras drogas a ser obtida e utilizada no tratamento da tuberculose humana foi a isoniazida ou hidrazida do ácido isonicotínico, associando-se, na atualidade, outros produtos considerados como de primeira linha, como a estreptomicina, o etambutol e a rifampicina, combinando o máximo de eficácia com um grau aceitável de toxicidade (YOUMANS, 1979; MANDELL e PETRI Jr., 1996).

A isoniazida (INH) é seletiva para micobactérias e concentrações excessivas de 500mg/ml são requeridas para inibir o crescimento de outros microrganismos, ou seja, 10.000 a 20.000 vezes superior à concentração requerida para inibir o crescimento das micobactérias patogênicas (MANDELL e PETRI Jr, 1996).

Segundo Tavares (1996) a isoniazida é um quimioterápico essencialmente bactericida sobre as micobactérias em crescimento ativo, com pequena atuação sobre as de crescimento lento e não atuando contra as formas dormentes do bacilo da tuberculose. No mesmo sentido Mandell e Petri Jr. (1996) afirmaram que a isoniazida é bacteriostática para os bacilos em repouso e bactericida para os microrganismos em divisão rápida. A ação bacteriostática da isoniazida ocorre devida sua interferência com importantes funções de óxido-redução de enzimas que empregam metais como cobre e ferro (YOUMANS, 1979).

O mecanismo de ação da isoniazida é complexo e ocorre com a quelação de íons metálicos, especialmente do cobre, essencial ao metabolismo da micobactéria. A isoniazida inibe a síntese de lipídeos precursores do ácido micólico, componente fundamental da parede celular das micobactérias por interferir com a enzima micolase-sintetase, o que acarreta a formação de bacilos estruturalmente deficientes que são lisados (TAVARES, 1996).

A isoniazida tem ação prejudicial no metabolismo da glicose e na respiração celular das micobactérias por competir com a nicotinamida na formação do NAD, devido a grande similaridade química entre ambas. A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) tem sua estrutura prejudicada pelo ácido isonicotínico formado a partir da isoniazida e que substitui a nicotinamida do NAD, que dessa forma não exerce sua atividade de elemento formador de citocromos que atuam como coenzimas nos processos metabólicos (YOUMANS, 1979; TAVARES, 1996).

O desenvolvimento da resistência à isoniazida pode ocorrer em razão das características constitucionais da parede celular, de alto conteúdo lipídico, que dificulta a penetração da droga e por alterações mediadas por genes que ocorrem um em cada  $10^6$  bacilos (MANDELL e PETRI Jr, 1996; HIRATA et al., 1997).

A isoniazida é metabolizada no fígado onde sofre acetilação por ação da enzima N-acetil-transferase, resultando na formação de ácido isonicotínico e acetil-idrazina que são substâncias inócuas para as micobactérias (TAVARES, 1996). De 75 a 95% da dose terapêutica de isoniazida é excretada pela urina em 24 horas, a maior parte na forma de metabólitos (MANDELL e PETRI Jr, 1996). O efeito colateral principal da isoniazida no homem é a hepatite tóxica que raramente provoca quadro clínico, mas há registros de necrose hepática (TAVARES, 1996).

O dimetilsulfóxido (DMSO) é um solvente altamente hidrofílico, melhor que a água para muitas substâncias e que ao ser hidratado há liberação de calor. É um líquido claro, variando do incolor ao amarelado, com ponto de congelamento de 18,5°C e ponto de ebulição de 189,0°C; sua molécula tem uma estrutura piramidal contendo enxofre, oxigênio e átomos de carbono e hidrogênio, sendo a ligação enxofre-oxigênio inteiramente polar e sendo considerado aprótico por não doar seus prótons em interações químicas. Muitas vezes podemos observar traços de DMSO nas nossas fontes de água potável, água das chuvas e dos oceanos, além do que, podemos encontrá-lo, também, juntamente com seus metabólitos DMS (dimetilsulfide) e DMSO<sub>2</sub> (dimetilsulfone) em alimentos, no sangue e adrenais de bovinos. Contribui para o flavor do leite e da cerveja (PAES, 1990).

Dessa forma, podemos perceber que o DMSO é um adjuvante importante para carrear os medicamentos para dentro das células ou dos microrganismos, sem afetar a membrana das mesmas, assim facilitando e potencializando o efeito dos medicamentos. Apesar desse seu utilíssimo poder e de ser uma droga de baixa toxicidade e grande margem de segurança, o DMSO é curiosamente pouquíssimo estudado neste sentido, sendo pioneira a pesquisa de Paes (1990), que observou a potencialização dos efeitos terapêuticos da isoniazida, quando da associação com DMSO, no tratamento da tuberculose. Provavelmente, isto ocorreu porque o DMSO carrega a isoniazida para dentro da célula. O mesmo autor quantificou a potencialização da isoniazida pelo DMSO, apurando

que o resíduo de bacilos infecciosos em todos os tecidos no caso da associação foi efetivamente menor que no grupo controle, sem tratamento. Por outro lado, sabe-se que o DMSO também captura e remove radicais hidróxidos livres, remove radicais livres de oxigênio, por meio do seu metabólito DMS, consequentemente, configura uma ação anti-inflamatória, anti-isquêmica, crioprotetora e radioprotetora (PAES, 1990).

O presente trabalho objetivou avaliar, quantitativamente, a potencialização da ação terapêutica da isoniazida (INH) associada ao DMSO, em sistema biológico suscetível, experimentalmente infectado por uma estirpe altamente patogênica de *M. bovis*, além do exame das estruturas anatomopatológicas e da composição micobacteriana aferida em termos quantitativos expressos em unidades formadoras de colônias (UFC).

## MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 70 hamsters (*Mesocricetus auratus*), machos, 40 dias de idade, pesando aproximadamente 100g. Durante o período experimental os animais permaneceram no infectório da Disciplina de Enfermidades Infecciosas da FMVZ-UNESP, distribuídos em caixas de polipropileno, cinco indivíduos cada, com ração e água potável *ad libitum*.

A estirpe AN5 de *Mycobacterium bovis*, em cultura pura, fornecida pelo Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo, foi utilizada para infecção experimental dos animais.

Foram pesados 100mg do substrato contendo colônias do agente, previamente ativado no sistema biológico hamster e cultivado em meio de Petragani. O material assim obtido foi dissolvido em 100ml de solução fisiológica esterilizada, contendo três gotas de Tween 80, essencial para boa dispersão das colônias na solução, e a seguir submetido, durante oito horas, a agitação magnética, em temperatura de refrigeração.

### Grupos experimentais

Ao início do experimento todos os animais foram inoculados, pela via intraperitoneal, na dose individual de 1mL do inóculo e mantidos em observação por 30 dias. A seguir dez animais, grupo referencial, escolhidos aleatoriamente, foram sacrificados para obtenção de órgãos e verificação do grau de lesões tuberculosas no momento em que foi iniciado o tratamento experimental nos demais grupos do experimento. Os 60 animais restantes divididos aleatoriamente em três grupos experimentais: G1, 20 animais, sem receber tratamento; G2, 20 animais tratados com isoniazida (100mg, CEME<sup>®</sup>), 30 a 60 dias pós-infecção, pela via oral, na dose diária individual de 10mg/kg de peso vivo; G3, 20 animais tratados com isoniazida associada com DMSO (99,5% pureza, Merck<sup>®</sup>), no período de 30 a 60 dias pós-infecção; isoniazida, pela via oral, na dose diária individual de 10mg/kg de peso vivo e concomitantemente, DMSO, pela mesma via e dose apontadas.

Todos os animais foram sacrificados no 60º dia pós-inoculação, desinfetados e necropsiados em condições anti-sépticas. Para a realização das culturas foram utilizados: lobo pulmonar esquerdo, fragmentos de fígado, rim esquerdo, e dois terços da porção ventral do baço. Para o histopatológico, o lobo pulmonar direito, rim direito, fragmento de fígado e o restante do baço foram utilizados.

### Microbiológico

Foram colhidos 5g de cada um dos órgãos e triturados em 5ml de solução fisiológica 0,9% estéril em Graal. Realizou-se descontaminação com hidróxido de sódio (NaOH 8%), atingindo um pH final entre 6,8 e 7,0. Com alíquotas de 0,2ml, equivalente a 40mg, realizou-se semeadura em meio de Petragani, e incubou-se horizontalmente a 37°C por sete dias. Após, queimou-se as tampas de algodão, fechou-se com rolha de cortiça, e incubou-se em posição vertical, a 37°C, por 40 dias, com contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) ao final. Realizou-se a contagem das colônias em uma área de 4cm lineares, sendo número obtido multiplicado pelo fator de correção 25 para obtenção de número de UFC em 1g do órgão testado.

## Histopatológico

Os fragmentos dos órgãos obtidos passaram por fixação em líquido de Bouin, desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em blocos de parafina. Deste material foram realizados cortes histológicos que foram corados pelo método da hematoxilina-eosina. Apenas os resultados das lâminas correspondentes aos materiais obtidos a partir de seis animais de cada grupo, sorteadas aleatoriamente, foram incluídos no presente estudo.

As lâminas foram examinadas ao microscópio de luz comum, para avaliação do grau das lesões tuberculosas no pulmão, fígado, baço e rim, pela morfometria para se quantificar e mensurar os granulomas tuberculosos presentes em fígado e pulmão, com o sistema de análise de imagens no qual as imagens das lesões granulomatosas foram delimitadas e contornadas com o auxílio de um cursor, sendo então processadas e analisadas pelo programa Bioscan 4.0, sistema Optimas. Por esta análise foram avaliados o número de granulomas por corte, a média da área dos granulomas por corte e a porcentagem da área do corte ocupada pelos granulomas.

## Análise estatística

Na análise estatística foi utilizada a prova não paramétrica de Kruskal-Wallis para amostras independentes, segundo Curi (1997), com nível de significância  $\alpha=0,05$  e dois graus de liberdade.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os animais apresentaram, durante os primeiros 30 dias pós-infecção, um quadro sugestivo de tuberculose podendo se observar o emagrecimento e a diminuição da atividade física.

### Grupo Referencial

Aos 30 dias pós-infecção, os animais do grupo referencial apresentaram, à necropsia, comprometimento ganglionar e lesões tuberculosas bem estabelecidas no pulmão e fígado, com lesões mais severas de aspecto granulomatoso no baço e gânglios abdominais, que ao corte apresentavam conteúdo de pus caseoso. As lesões tuberculosas renais eram menos acentuadas, figurando os rins como as estruturas menos afetadas.

Esses achados, associados aos valores revelados pelos exames microbiológicos, apresentaram variações para os diferentes tecidos, oscilando entre 7.500 e 30.000 UFC/g de fígado; 7.500 e 25.000 UFC/g de pulmão e rim; e 12.500 e 30.000 UFC/g de baço. Portanto, as lesões tuberculosas estavam bem estabelecidas, configurando um processo de tuberculose generalizada em evolução que afetava os animais incluídos nos diferentes grupos experimentais do presente estudo. Os órgãos afetados e severidade das lesões estão de acordo com parâmetros encontradas em trabalhos que utilizaram o hamster como modelo biológico para avaliar a ação de produtos na evolução da tuberculose experimentalmente induzida (FERREIRA NETO et al., 1994; FERREIRA NETO et al., 1996; UGAZ et al., 1999; PALERMO-NETO et al., 2001).

### Grupo 1: controle

Os resultados do grupo controle mostram que todos os animais apresentavam-se extremamente caquéticos, apáticos e praticamente agônicos.

Os achados de necropsia apontaram um severo quadro de tuberculose generalizada, com acentuado comprometimento ganglionar, hepato e esplenomegalia acompanhadas de grande quantidade de granulomas; e o pulmão e os rins tinham grande parte de suas áreas ocupadas por lesões tuberculosas. Ao exame histopatológico foram encontradas lesões tuberculosas múltiplas e extensas particularmente no fígado, pulmão, baço e rins. Lesões semelhantes foram descritas por Ferreira Neto et al. (1994) quando padronizaram a utilização de hamster como modelo biológico no estudo da tuberculose experimentalmente induzida.

Nos pulmões foram observadas lesões granulomatosas múltiplas e extensas, por vezes

confluentes, de localização peribronquial ou subpleural, constituídas predominantemente por células epitelióides e raras células mononucleares; sendo algumas lesões circundadas por tecido conjuntivo. A presença de necrose era discreta aparecendo nas lesões mais extensas.

No fígado, observaram-se também lesões múltiplas, de localização variável, constituídas por células epitelióides e células gigantes multinucleadas, muitas das quais circundadas por tecido conjuntivo.

No baço, as lesões comprometiam, principalmente, a cápsula do órgão, porém também foram observadas acometendo o parênquima. As lesões capsulares eram compostas por área necrótica central circundada por células epitelióides em grande número, raras células mononucleares e reações granulomatosas delimitadas por tecido conjuntivo. As lesões parenquimatosas comprometiam a região da polpa branca e eram basicamente compostas por células epitelióides. Alguns animais mostraram lesões capsulares extensas com necrose e circundadas por reação granulomatosa e tecido conjuntivo.

Nos rins, as lesões comprometiam predominantemente a cápsula do órgão e apresentavam morfologia semelhante à observada nas lesões esplênicas.

O exame morfométrico demonstrou uma expansão quantitativa, aquilatada tanto em termos do número de granulomas como na expansão dos mesmos, sendo que para o tecido hepático o número médio de granulomas foi de 28,66, área média dos granulomas de  $237.377,27\mu\text{m}^2$ , e a porcentagem média da área de corte ocupada pelos granulomas atingiu 9,15%, já para o tecido pulmonar, os valores foram de 11,5;  $230.321,92\mu\text{m}^2$  e 13,52%, respectivamente.

A expressão quantitativa dos valores deste grupo apresentou, igualmente, flutuações entre 10.000 e 50.000 UFC/g de fígado, pulmão e rim; e 25.000 e 62.500 UFC/g de baço, comprovando a persistência do processo progressivo de infecção generalizada em todos os animais deste grupo.

De fato, quando avaliamos os resultados obtidos com os animais do G2, verificamos que quando tratados pela isoniazida, os valores encontrados, para os parâmetros, apresentaram uma relativa benignidade em relação ao quadro demonstrado pelos animais do G1. Pode-se assim observar uma condição de relativo equilíbrio funcional e aparência externa melhor nos animais, comparada à observada no G1.

## Grupo 2: tratamento com INH

Verificou-se que após 30 dias de administração somente de isoniazida, os animais infectados ainda apresentaram, à observação visual, quadro de magreza e apatia. Revelaram, à necropsia, lesões tuberculosas, de relativa gravidade, disseminadas por todos os órgãos, exceto para o baço e gânglios que estavam bem comprometidos.

Ao exame histopatológico observou-se, nos pulmões, a formação de granulomas múltiplos, de tamanho reduzido com localização peribronquial e subpleural, constituídos por acúmulos focais de células epitelióides e raras células mononucleares, circundadas por tecido conjuntivo. Já no fígado, os granulomas eram constituídos por células epitelióides, células gigantes multinucleadas e halo formado por células mononucleares, sendo esta reação delimitada por tecido conjuntivo.

As lesões esplênicas e renais possuíam morfologia semelhante à descrita para as lesões hepáticas. A cápsula era a localização preferencial dos granulomas, em ambos os órgãos, porém, no baço foram observadas lesões acometendo a polpa branca.

Os resultados da morfometria mostram que, para o tecido hepático, o número médio de granulomas foi de 12,83, a área média dos granulomas, de  $35.779,02\mu\text{m}^2$  e a porcentagem média da área de corte ocupada pelos granulomas atingiu 1,05%; enquanto que para o tecido pulmonar, os valores foram de 7,5,  $154.465,04\mu\text{m}^2$  e 6,50%, respectivamente.

Ao exame microbiológico observaram-se valores do isolamento de *M.bovis* com flutuações entre 1.000 e 8.000 UFC/g de fígado, 2.000 e 10.000 UFC/g de pulmão e baço, e 1.000 e 10.000 UFC/g de rim; caracterizando, ainda, a infecção em todos os animais do grupo.

Os exames anátomo e histopatológicos, aliados aos valores morfométricos apresentaram menor intensidade das lesões encontradas. À análise estatística foi significativamente menor em relação ao G1 somente em relação à área dos granulomas no fígado.

Os exames microbiológicos sugerem uma diferença aparente entre os valores absolutos em relação ao G1 e G2. De fato, a análise estatística desses dados comprovou serem os valores de isolamento de *M.bovis* para o G2 significativamente menores que os do G1. Contudo, a ação da

isoniazida não foi suficiente para eliminar a infecção dos animais tratados, nas condições aqui apresentadas.

### Grupo 3: tratamento com INH e DMSO

No tocante aos resultados do G3, ao final de 30 dias de administração de isoniazida e DMSO, os animais não apresentavam mais qualquer condição aparente de agravo à saúde, demonstrando boa performance em termo de peso, aparência externa e atividade física.

À necropsia observaram-se, ainda, lesões tuberculosas mínimas, em todos os órgãos estudados, sendo as lesões renais quase que imperceptíveis, e as ganglionares, ausentes.

A histopatologia revelou, ainda, lesões teciduais menores. Nos pulmões os granulomas observados foram de tamanho reduzido, constituídos predominantemente por células epitelióides e raras células mononucleares. No fígado, as lesões granulomatosas eram, também, de tamanho muito reduzido, e constituídas por células epitelióides e células gigantes multinucleadas, sendo discreta a presença de células mononucleares.

No baço foram observadas lesões discretas na cápsula e polpa branca e, nos rins, apenas discretas lesões capsulares.

A quantificação morfométrica para o tecido hepático mostrou média de 9,5 granulomas, com área média de  $6.606,29\mu\text{m}^2$ , e média de 0,28% de área ocupada, enquanto que para o tecido pulmonar, os valores foram de 5,17 granulomas em  $76.236,84\mu\text{m}^2$ , com 2,03%.

A expressão quantitativa apresentou variações entre 25 e 2.400 UFC/g, no fígado e no pulmão; 225 e 4.000 UFC/g no baço; e 75 e 3.200 UFC/g no rim, caracterizando que, também neste grupo, a infecção persistia, ainda, em todos os animais.

Tal condição, essencial para a diferenciação comparativa entre os dois grupos a serem tratados (G2 e G3) deveu-se, fundamentalmente, à escolha de um sistema biológico bastante sensível, representado pelo hamster, aliada à elevada patogenicidade da estirpe utilizada de *M. bovis*.

A intensidade das alterações funcionais, anátomo e histopatológicas, dos animais do G1, consubstanciadas por sua análise morfométrica, bem como ao elevado número de UFC/g de tecido, detectado ao exame microbiológico, denotando a extrema proliferação do agente patogênico, são testemunhos inequívocos da severidade do processo natural de evolução da tuberculose, propiciando uma condição essencialmente favorável à avaliação comparativa dos efeitos dos tratamentos adotados para G2 e G3.

### Análise estatística

Uma análise preliminar globalizada dos valores da Tabela 1, relativos aos isolamentos de *M. bovis*, expressos em termos da média de UFC/g de tecido, segundo os diferentes grupos, seus respectivos componentes e correspondentes órgãos, sugere a existência de diferenças apreciáveis entre os valores absolutos encontrados, tanto para os grupos como em relação a todas as demais variáveis consideradas.

O mecanismo natural de evolução do processo doença poderia explicar a superioridade aparente dos valores absolutos registrados para o G1 em relação ao grupo referencial.

Quando avaliamos comparativamente os resultados do grupo controle com os obtidos pelos grupos experimentais, verificamos uma nítida tendência decrescente dos valores absolutos do G1, G2 e G3, atribuível aos tratamentos a que foram submetidos os dois últimos.

Essa tendência decrescente resulta das diferenças quantitativas efetivamente verificadas entre cada um dos grupos experimentais entre si e com o grupo controle, como pode ser observado nas Tabelas 2 e 3, que estabelecem a comparação entre os valores percentuais de UFC/g de tecido do G1, G2 e G3, segundo os diferentes órgãos.

Tais diferenças caracterizam efetivamente uma redução percentual expressiva do número de UFC/g de tecido entre o G1 e G2; G1 e G3; e G2 e G3.

O número de granulomas nos tecidos hepático e pulmonar demonstra diferenças significativas, em ambos os casos, apenas entre G1 e G3; ao passo que os dados relativos à área dos granulomas propiciaram elementos para configurar, no tecido hepático, uma diferença significativa entre os três grupos, porém no tecido pulmonar, somente entre G1 e G3.

Confirma-se assim a eficiência do tratamento, a julgar-se pela performance saudável apresentada pelo G3 ao final do tratamento, pelo reduzido agravo anátomo e histopatológico remanescente, cuja análise estatística revelou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ), comparativamente ao G1, em todos os parâmetros analisados.

De fato, a análise estatística revelou serem os valores residuais do *M. bovis*, G3, para todos os tecidos, inferiores aos do G1. Tal condição verificou-se no G2, com exceção ao tecido hepático. Além disso, verificou-se também que os valores microbiológicos do G3, foram significativamente menores que os obtidos a partir dos demais grupos.

Tais observações configuram, de forma indiscutível, a ação potencializadora do DMSO sobre a ação antimicobacteriana da isoniazida.

Ressalte-se, contudo, que a despeito dos efeitos promissores revelados, o tratamento em questão não foi suficientemente eficaz para eliminar por completo o processo de infecção progressiva dos animais do experimento pelo *M. bovis*.

Como entre as características do DMSO não figuram a ação antimicrobiana, o presente estudo coloca em evidência a peculiaridade deste produto em ultrapassar e aumentar a permeabilidade de membranas biológicas, atuando como carreador da isoniazida, facilitando sua penetração nas lesões tuberculosas e permitindo, mesmo, seu acesso mais íntimo ao *M. bovis* com conseqüente ultrapassagem da complexa parede celular deste agente.

Estes resultados obtidos no efeito de potencialização da ação terapêutica da isoniazida frente a uma estirpe patogênica do *M. bovis*, são compatíveis com os achados de Paes (1990) que utilizou a isoniazida associada ao DMSO no tratamento de bovinos tuberculosos, obtendo 78% de cura clínica, sem, contudo, contar com a confirmação dos parâmetros ora utilizados.

**TABELA 1.** Valores quantitativos dos isolamentos de *Mycobacterium bovis* em termos de UFC/g de tecido, segundo os diferentes grupos, seus respectivos componentes e correspondentes órgãos. Botucatu, 1999.

ÓRGÃOS	Média (UFC/g de tecido)			
	Referencial	G1	G2	G3
Fígado	21250,00	29500,00	3185,00	1208,75
Pulmão	17500,00	25200,00	4850,00	1190,00
Baço	32750,00	41000,00	5750,00	1893,75
Rim	16000,00	24000,00	3820,00	1202,50
Média por animal	87500,00	119750,00	17605,00	5495,00
Média por órgão	21875,00	29937,00	4401,25	1373,50

**TABELA 2.** Comparação entre G1, G2 e G3 em percentuais de UFC/g de tecido. Botucatu, 1999.

Grupo	Órgão (%)			
	Fígado	Pulmão	Baço	Rim
G1	100,00	100,00	100,00	100,00
G2	10,79	19,24	14,02	15,91
G3	4,09	4,72	4,61	5,01
Redução percentual G1 : G2	89,21	80,76	85,98	84,09
Redução percentual G1 : G3	95,91	95,28	95,39	94,99

TABELA 3. Comparação entre G2 e G3 em percentuais de UFC/g de tecido. Botucatu, 1999.

Grupo	Órgão (%)			
	Fígado	Pulmão	Baço	Rim
II	100,00	100,00	100,00	100,00
III	37,95	24,53	32,93	31,47
Redução percentual G2 : G3	62,05	75,47	67,07	68,53

## CONCLUSÕES

Com estes resultados, pode-se concluir que somente a associação de isoniazida com DMSO, em igual dosagem, no período de 30 dias consecutivos, foi capaz de reduzir, de forma significativa, a intensidade do processo doença, na tuberculose experimental, em hamsters, e restaurar o equilíbrio orgânico aparente destes hospedeiros, comprovando a ação potencializadora do DMSO na atividade antimicobacteriana da isoniazida sobre o *M. bovis*, "in vivo", porém não suficientemente eficazes para a completa eliminação do processo de infecção progressiva de hamsters, pelo agente.

## REFERÊNCIAS

- BEER, J. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Zaragoza: Editorial Acribia, 1981, 2, 347p.
- BLOOD, D.C., RADOSTITIS, O.M., GAY, C.C. **Veterinary Medicine**. London: Bailliere Tindal, 1994, 1763p.
- CORREA, W.M., CORREA, C.N.M. **Enfermidades Infecciosas dos Mamíferos Domésticos**. Rio de Janeiro: MEDSI Editora Médica e Científica, 1992, 843p.
- CURI, P.R. Metodologia e Análise da Pesquisa em Ciências Biológicas. Botucatu: Tipomic, 1997, 263p.
- FERREIRA NETO, J. S.; PINHEIRO, S. R.; MORAIS, Z. M.; SINHORINI, I. L.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Avaliação quantitativa da concentração de micobactérias em órgãos e humores de hamsters experimentalmente infectados com *Mycobacterium bovis*, estirpe AN5. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 31, p. 131-139, 1994.
- FERREIRA NETO, J. S.; PINHEIRO, S. R.; MORAIS, Z. M.; SÁ ROCHA, L. C.; SINHORINI, I. L.; ITO, F. H.; VASCONCELLOS, S. A. Quantitative evaluation of the tuberculosis evolution in hamsters submitted to na eight-week trichlorfon treatment and infected with *Mycobacterium bovis*, strain AN5. **Brazilian Journal Veterinary Research and Animal Science**, v. 33, n. 3, 1996.
- GRANGE, J.M. The mycobacteria. In: PARKER, M.T., DVERDEN, B.L. Eds. Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, Virology and Immunity. Philadelphia: B.C.Decker, 1990, 709p.
- HIRATA, R.O.C. et al. Aplicação de técnicas de biologia molecular na avaliação da resistência de *Mycobacterium tuberculosis* à drogas antimicrobianas. **Rev. Ci. Farmacol. S. Paulo**, v.18, p.87-100, 1997.
- JONES, T.C., HUNT, R.D. **Veterinary Pathology**. Philadelphia: Lea Febiger, 1983, 1792p.

MANDELL, G.L., PETRI JR., W.A. Drugs used in the chemotherapy of tuberculosis, *Mycobacterium avium* complex disease and leprosy. In: HARDMAN, J.G., LIMBIRD, L.E. Eds. **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. New York: McGraw-Hill, 1996, p.1155-1174.

MARIANO, M. The experimental granuloma. A hypothesis to explain the persistence of the lesion. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v.37, p.161-176, 1995.

NEILL, D. et al. Bovine tuberculosis – Pathogenesis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. **Vet. Microbiol.**, v.40, p.41-52, 1994.

PAES, A.C. **Redução do período de tratamento da tuberculose bovina com associação de estreptomicina, isoniazida e dimetil sulfóxido**. Botucatu, 1990, 33p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”.

PALERMO-NETO, J.; SANTOS, G. O.; GUERRA, J. L.; PINHEIRO, S. R. Glue solvent inhalation impairs host resistance to *Mycobacterium bovis* – induced infection in hamsters. **Veterinary and Human Toxicology**, v. 43, n. 1, p. 1-5, 2001.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Antiinfeciosos**. São Paulo: Ateneu, 1996, 792p.

UGAZ, E. M. A.; PALERMO NETO, J.; PINHEIRO, S. R.; GUERRA, J. L. Effects of prenatal diazepam treatment on *Mycobacterium bovis* –induced infection in hamsters. **Immunopharmacology**, v. 41, p. 209-217, 1999.

YOUMANS, G.P. **Tuberculosis**. Philadelphia: W.B.Saunders, 1979, 511p.

**Recebido em: 09/10/2007**

**Aceito em: 14/07/2008**