

RELAÇÃO ENTRE A DOSE DE *M. LEPTAEMURIUM* EXPERIMENTALMENTE INOCULADA E A SOBREVIVÊNCIA DE RATOS TRATADOS E NÃO TRATADOS PELA 4-4' DIAMINODIFENILSULFONA

PROF. W. A. HADLER*
L. M. ZITI**

As relações entre as doses de *M. lepraemurium*, o período de latência, o desenvolvimento das lesões e, principalmente, a sobrevivência de ratos experimentalmente inoculados, têm sido pouco estudadas. Variações entre 1 e 1×10^{-4} na dose inoculada, provocam, em camundongos injetados por via intracorneana, diferenças quanto ao tempo de latência e à intensidade das lesões locais e gerais, havendo nítida relação entre a diluição e o desenvolvimento das lesões (8).

A citada relação possui importância, inclusive no que se refere aos estudos de quimioterapia experimental da lepra murina. Por esse motivo tem sido sugerida a padronização da quantidade de inóculo, nos ensaios quimioterápicos, mesmo que as técnicas para a determinação do número, ou do peso, de bacilos sejam sujeitas a causas de erro (3, 4, 5).

No presente trabalho será estudado o efeito da dose de bacilos sobre a evolução da moléstia, provocada em ratos inoculados por via intraperitoneal e submetidos, ou não, ao tratamento sulfônico.

MÉTODO: Ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando 90-120 g foram inoculados, por via intraperitoneal, com doses diferentes de uma mesma suspensão de *M. lepraemurium*. A suspensão foi preparada pelo método usual (2), sendo o peso de bacilos, por unidade de volume da suspensão, determinado por método anteriormente descrito (5). Uma vez conhecida a quantidade de bacilos, a suspensão foi diluída de forma a obterem-se 3 concentrações, na mesma unidade de volume; as diluições foram feitas com o máximo rigor. Apesar do peso absoluto de bacilos, contido na suspensão, ter sido determinado por método sujeito a causas de erro (5), as relações entre as doses usadas é correta.

Uma parte dos animais foi mantida sem tratamento; outra parte foi tratada pelo 4-4' — diaminodifenilsulfona, por via oral, sendo a substância administrada em mistura com a ração, na proporção de 0,3%; os animais ingeriram, em média 40 mg de sulfona por dia, dose esta que apresenta atividade na lepra murina (7). O tratamento foi iniciado no 7.º dia que sucedeu a inoculação.

Os animais foram reunidos, segundo a dose de bacilos inoculada, em 3 grupos:

GRUPO 1 — 40 ratos inoculados com 0,5 ml de suspensão contendo 5,7 mg de *M. lepraemurium*; 20 permaneceram sem tratamento e 20 foram tratados com sulfona;

GRUPO 2 — 40 ratos inoculados com 0,5 ml de suspensão contendo 2,85 mg de *M. lepraemurium*; 20 ratos não receberam tratamento e 20 foram tratados com sulfona.

* Depart. Histologia e Embriol., Faculd. Medicina de Ribeirão Preto — Brasil.

** Secção de Quimioterapia, Instituto Butantan, S. Paulo — Brasil.

GRUPO 3 — 40 ratos inoculados com 0,5 ml de suspensão contendo 0,57 mg de *M. lepraemurium*; 20 ratos não receberam tratamento e 20 foram tratados com sulfona.

Aproximadamente 10 animais de cada grupo foram sacrificados periodicamente, cada 60 dias, a partir do 90.º dia que sucedeu a inoculação. Nestes animais estudou-se, macro e microscopicamente, a evolução das lesões durante o decorrer da experimentação. O estudo histológico foi feito após fixação em Bouin ou em formalina a 10%, inclusão em parafina e coloração pela H. E., e Ziehl-Neelsen.

Nos animais restantes (11 não tratados e 10 tratados do grupo 1; 12 não tratados e 10 tratados do grupo 2; 10 não tratados e 11 tratados do grupo 3) a moléstia evoluiu até a morte natural dos ratos. Baseado nestes dados estudou-se a sobrevivência até o 655.º dia após a inoculação.

A sobrevivência foi analisada estatisticamente e comparada com a intensidade das lesões, verificadas após à necropsia dos animais sacrificados e dos mortos naturalmente.

Para a análise estatística da sobrevivência efetuou-se análise de variância das recíprocas dos valores obtidos, sendo as variâncias decompostas por comparação ortogonal. Além disso fez-se o estudo da regressão dose-sobrevivência nos 3 grupos de animais; usou-se também a recíproca dos valores da sobrevivência para estes cálculos.

RESULTADOS

As médias harmônicas da sobrevivência nos vários grupos estão expostas no quadro 1. Como os valores individuais dispõem-se assimetricamente em torno da média, não foi efetuado o cálculo do desvio padrão diretamente, mas a partir das recíprocas dos valores da sobrevivência (Quadro 2).

A análise de variância da sobrevivência e as comparações ortogonais estão expostas no quadro 3. Estes dados revelam: a) a sobrevivência dos ratos tratados com sulfona difere significativamente da dos animais não tratados, isto é, o tratamento sulfônico prolonga a sobrevida dos ratos com lepra murina; b) a sobrevivência dos ratos tratados com sulfona não possui relação com a dose de bacilos inoculada, não havendo diferença significativas entre os 3 grupos injetados com 5,7 — 2,85 e 0,57 mg de bacilos, respectivamente; c) a sobrevivência dos animais não tratados, ao contrário, apresenta-se relacionada com a dose de bacilos inoculada, sendo a relação altamente significativa, mostrando que quanto maior a quantidade do inóculo menor a sobrevivência e vice-versa; esta relação é linear, quando se tomam os logaritmos das respectivas doses, sendo muito pequenos (insignificantes) os desvios da linearidade.

Foi calculada a linha de regressão da sobrevivência em função da dose inoculada, nos 3 grupos de ratos (Quadro 4). O pequeno valor de *b* (coeficiente de regressão), para os animais tratados e principalmente, o teste $b = 0$, estão de acordo com a ausência de diferenças significativas de sobrevivência nos 3 grupos de ratos que receberam tratamento sulfônico; revela não haver relação entre a dose de bacilos e a sobrevivência, quando os animais recebem tratamento sulfônico, nas condições usadas. Ao contrário, nos ratos não tratados a regressão da dose de bacilos em função da sobrevivência apresenta coeficiente de regressão de valor elevado, o que era esperado com base nos resultados da análise de variância. A regressão é linear, dentro das doses usadas, o que permite estimar, dentro destes limites, a dose inoculada, uma vez conhecida a sobrevivência e vice-versa. Este método revela que é possível dosar biologicamente uma suspensão de bacilos, dependendo a exatidão da dosagem da precisão do peso absoluto da amostra usada como padrão; este é o ponto falho do método, pois, os valores absolutos são sujeitos a erros. No gráfico estão projetadas as linhas de regressão do logaritmo da dose de bacilos, em função da sobrevivência, nos 3 grupos de ratos, tanto para os animais tratados como para os não tratados. No mesmo gráfico estão projetados os intervalos de confiança ($P = 0,05$) para

as 2 linhas de regressão, calculadas em relação ao ponto médio central. Nos ratos tratados os intervalos de confiança são mais amplos, o que depende das variações dos valores da sobrevivência em torno do valor médio. O gráfico mostra que as duas linhas de regressão partem de um ponto comum, de onde divergem. O afastamento entre as duas linhas é proporcional à dose de bacilos inoculada. Êste fato revela que os resultados do tratamento sulfônico são tanto mais evidentes quanto maior a dose do inóculo e vice-versa.

Nos animais não tratados, sendo linear a regressão dose de bacilos — sobrevivência, é possível avaliar o ritmo com que se reproduz o *M. lepraemurium*, quando inoculado na cavidade peritoneal do rato. A morte dos ratos com lepra murina, assim induzida, ocorre quando as lesões são extensas e intensas, isto é, quando a infecção atinge alto grau, o qual é relativamente constante, fazendo abstração às variações individuais que não são acentuadas. Baseado neste fato e supondo que o ritmo de multiplicação dos bacilos seja independente do número de células bacterianas inoculadas e seja constante durante toda a evolução da moléstia, é permitido relacionar as doses de inóculo com sobrevivência e com o ritmo de multiplicação dos bacilos. Para isso, tomou-se como base a dose de 0,57 mg de bacilos, para a qual a sobrevida média dada pela linha de regressão é de 396 dias. Como o crescimento dos bacilos se dá em progressão geométrica, após 3 gerações o pêso será de 4,56 mg; êste valor na linha de regressão corresponde à sobrevivência média de 230,5 dias. Portanto, 3 gerações de bacilos ocorrem em $396 - 230,5 = 166,5$ dias e uma geração em 55,1 dias. Os intervalos de confiança para êste valor ($t = 0,05$) são 51,0 e 59,2 dias.

Os resultados dos exames anátomo-patológicos revelam que os ratos não tratados morrem sempre com intensas lesões leprosas, que atingem vários órgãos. A avaliação quantitativa da intensidade das lesões nos animais não tratados, mortos naturalmente, baseada no número e na extensão das lesões e, na quantidade de bacilos, não mostra variação relacionada com a dose do inóculo. Ao contrário, nos animais não tratados, porém sacrificados periodicamente, é possível evidenciar relação entre a intensidade das lesões e a dose de inóculo, nos diversos períodos de evolução da moléstia. Para um determinado período de evolução, as lesões são tanto mais extensas e numerosas, quanto maior o inóculo. Nos ratos tratados pela sulfona o exame microscópico mostra lesões com aspectos em regressão idênticas às descritas anteriormente (1,7).

DISCUSSÃO

Os resultados apresentados revelam que em ratos não tratados a sobrevivência média depende da dose de bacilos inoculada; a regressão da sobrevivência em função da dose do inóculo é expressa por uma linha reta, dentro dos limites usados, o que permite dosar biologicamente o inóculo. Ao contrário, nos animais sob tratamento sulfônico não há relação entre a dose do inóculo e a sobrevivência, uma vez que o coeficiente de regressão sobrevivência — dose do inóculo é insignificante. Conseqüentemente, os resultados de tratamento para uma quantidade fixa de DDS, baseados na sobrevivência dos animais tratados, em comparação com os contrôles, são tanto mais nítidos quanto maior a dose de bacilos injetada. Nos ensaios quimioterápicos é então vantajoso o emprêgo de grandes quantidades de inóculo.

Há um aparente paradoxo entre os resultados da sulfonoterapia, baseados na sobrevivência e, a dose de bacilos inoculada, uma vez que os resultados são tanto mais nítidos quanto maior o inóculo. Êsse fato é responsável pela ausência de paralelismo entre as linhas de regressão da sobrevivência dos animais tratados e dos contrôles não tratados. Supondo que a ação da sulfona seja idêntica em tôdas as fases da infecção, não se deveria verificar tal ocorrência e a linha de regressão da sobrevivência dos animais tratados deveria ser paralela à linha de regressão dos animais contrôles não tratados. A falta de paralelismo verificada pode ser explicada admitindo que a sulfona atue com intensidade diferente nas diversas fases de evolução da lepra murina.

O DDS aparentemente não tem ação sôbre as lesões de lepra murina em formação (7) e não parece atuar como bacteriostático, em relação ao *M. lepraemurium* (6). Por outro lado a atividade do DDS é verificada mais precocemente quando se efetua o tratamento de animais com lesões intensas, que quando se institui o tratamento logo após a inoculação do *M. lepraemurium* (7). Êstes fatos sugerem que a ação do DDS é mais nítida nas lesões de lepra murina plenamente desenvolvidas, que nas lesões em formação. É óbvio que quanto maior a dose de inóculo tanto mais cedo aparecem lesões plenamente desenvolvidas, fato êste aliás, revelado pelo exame anátomo patológico dos animais de experimentação. Talvez seja êste o motivo de serem tanto mais nítidos os resultados de tratamento quanto maior a quantidade do inóculo; assim sendo, seria possível explicar o aparente paradoxo e a ausência de paralelismo entre a linha de regressão da sobrevivência nos animais tratados e nos contrôles.

Os ratos inoculados com *M. lepraemurium* e tratados pelo DDS comportam-se, quanto à sobrevivência, como animais inoculados com menor dose de bacilos e não submetidos a tratamento sulfônico. Este fato está de acôrdo com o comportamento de ratos inoculados com bacilos recobrados de animais submetidos a tratamento sulfônico durante longo período; os bacilos assim recobrados parecem apresentar alterações da viabilidade e por isso produzem lesões que evoluem mais lentamente, sendo, portanto, maior a sobrevivência dos animais inoculados. (6). Nestas circunstâncias, além disso, as lesões são menos intensas desde o início; verifica-se também involução precoce de algumas lesões, o que apenas ocorre tardiamente nos animais inoculados com bacilos sem alterações da viabilidade e submetidos ao tratamento pelo DDS. Nesta última eventualidade as alterações involutivas das lesões são observadas com nitidez sómente a partir do 6.º mês de tratamento.

Êstes fatos sugerem que o DDS produz alteração da viabilidade dos bacilos e, por êste motivo, os animais sob tratamento aparentemente se comportam como se tivessem sido inoculados com bacilos submetidos a outros fatores que alteram a viabilidade, como, por exemplo, a temperatura. Bacilos submetidos a ação da temperatura produzem lesões cuja evolução é lenta e cujo período de latência é longo, como foi verificado em camundongos inoculados com *M. lepraemurium*, por via corneana (9).

O cálculo da duração de uma geração do *M. lepraemurium*, efetuado com base na linha de regressão dose-sobrevivência, fornece valores que diferem dos citados na literatura (8), os quais são baseados na evolução das lesões da córnea de camundongos. Apesar do processo usado no cálculo do ritmo de multiplicação dos bacilos ser semelhante ao usado por Naguib & Robson (8), o processo utilizado no presente trabalho parece mais apropriado, pelo seguinte: a) baseou-se em uma linha de regressão obtida através de 3 pontos o que diminui o êrro experimental; b) foi baseado em longo período de observação, o que diminui o êrro de medida. Se bem que as variações das doses de bacilos tenha sido relativamente pequena (bem menor que a usada por Naguib & Robson) (8), a regressão dose-sobrevivência é linear, dentro dos limites de doses empregados e apresenta

QUADRO I — MÉDIAS HARMÔNICAS DA SOBREVIVÊNCIA NOS GRUPOS ESTUDADOS (Em DIAS)

	Grupo I; animais inoculados com 5,7 mg de bacilos	Grupo 2; animais inoculados com 2,85 mg de bacilos	Grupo 3; animais inoculados com 0,57 mg de bacilos
Ratos não tratados	218	271	392
Ratos tratados	341	298	401

QUADRO 2 — RECÍPROCAS DAS MÉDIAS HARMÔNICAS DA SOBREVIVÊNCIA E DESVIO PADRÃO DA MÉDIA NOS GRUPOS ESTUDADOS

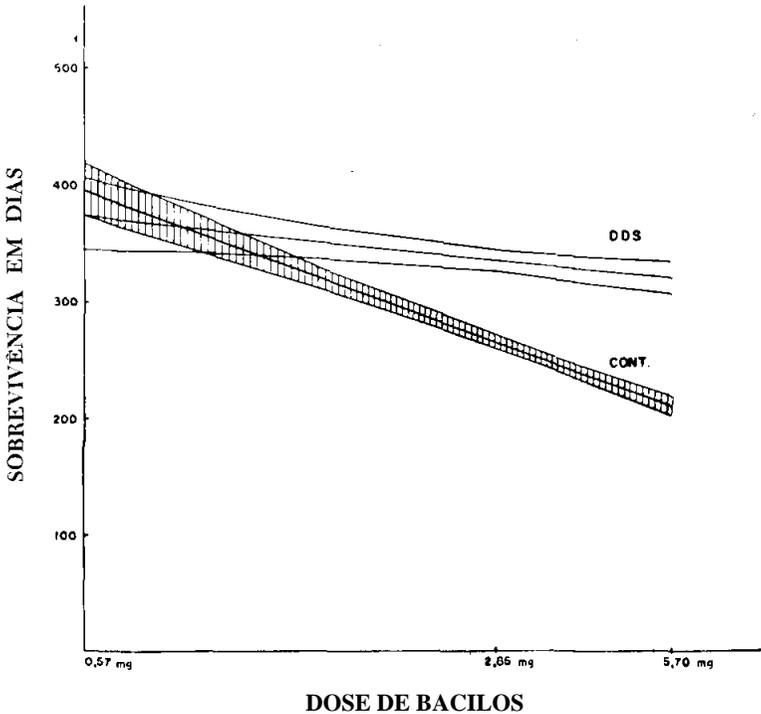
	Grupo 1 inoculado com 5,7 mg de bacilos		Grupo 2 inoculado com 2,85 mg de bacilos		Grupo 3 inoculado com 0,57 mg de bacilos	
	Média	Desvio pa- drão da média	Média	Desvio pa- drão da média	Média	Desvio pa- drão da média
Ratos não tratados	457	\pm 38,3	369	\pm 29,5	255	\pm 32,3
Ratos tratados	295	\pm 32,3	336	\pm 32,3	248	\pm 38,3

QUADRO 3 — ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA SOBREVIVÊNCIA NOS 3 GRUPOS ESTUDADOS

Fonte de variação	G. Liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado Médio	F	P
1— Sulfona	1	82.604	82.604	7,9	$\leq 0,01$
2— Entre doses de bacilos nos ani- mais tratados	2	19.861	9.930	0,9	N. S.
3— Entre doses de bacilos nos ani- mais não tra- tados	2	213.770	106.885	10,2	$\leq 0,01$
a - termo linear	1	207.948	207.948	19,9	$\leq 0,01$
b - desvios da linearidade	1	5.822	5.822	0,5	N. S.
Total dos grupos	5	336.095	67.219		
Erro experi- mental	58	606.577	10.458		
Total Geral	63	942.672			

QUADRO 4 — REGRESSÃO DOSE DE BACILOS SOBREVIVÊNCIA NOS RATOS TRATADOS PELO DDS E NOS NÃO TRATADOS

	Sx ²	Sxy	Sy ²	b	Sy ² x	Sb ²	Linha de Regressão
Não tratados	5,48	1.067,5	213.770	194,7	187,8	34,2	$Y = 396 + 194,7 x$
Tratados	7,70	342,2	19.861	44,4	581,6	75,5	$Y = 374 + 44,4 x$



LINHAS DE REGRESSÃO DOSE DE BACILOS — SOBREVIVÊNCIA EM RATOS INOCULADOS COM *M. LEPRÆMURIUM*, POR VIA PERITONEAL. COMPARAÇÃO ENTRE ANIMAIS TRATADOS PELO DDS E CONTRÔLES NÃO TRATADOS

intervalos de confiança pouco amplos. Porém, em ambos os métodos supõem-se que o ritmo de reprodução dos bacilos seja constante durante toda a evolução da lesão, o que não está demonstrado.

RESUMO

Grupos de ratos com 90-120 g de peso foram inoculados, por via intraperitoneal, com suspensão de *M. lepraemurium* contendo 5,7 mg, 2,85 mg ou 0,57 mg de bacilos. Uma parte dos animais de cada grupo foi tratada com DDS (tratamento iniciado 7 dias após a inoculação) permanecendo os animais restantes sem tratamento. Baseado no estudo histológico da evolução das lesões e na sobrevivência dos animais, estabeleceu-se comparação entre os diversos grupos. Os resultados da sobrevivência foram analisados estatisticamente (análise de variância e linha de regressão da sobrevivência), tendo-se verificado: a) o tratamento sulfônico aumenta a sobrevivência dos animais; b) o aumento da sobrevivência devido ao tratamento é independente da dose de bacilos inoculada; c) a sobrevivência dos animais não tratados depende da dose de bacilos inoculada, sendo tanto maior quanto menor a dose e vice-versa; d) nos animais não tratados a relação entre a sobrevivência e o log. da dose de bacilos é linear, dentro dos limites usados, o que permite efetuar dosagem biológica do inóculo, conhecendo-se

a sobrevivência dos animais; e) os resultados de tratamento sulfônico são tanto mais evidentes quanto maior a dose do inóculo.

Sendo linear a regressão dose do inóculo-sobrevivência, nos animais não tratados, calculou-se, com base nesses resultados, o ritmo de multiplicação do *M. lepraemurium*, obtendo-se o seguinte valor médio: 55,1 dias ($\pm 4,1$ para intervalos de confiança de 5%). O valor obtido mostra que o ritmo de reprodução do bacilo é lento.

Os resultados foram discutidos em relação ao mecanismo de ação do DDS na lepra murina.

SUMMARY

Rats, weighing from 90 to 120 g., were inoculated, by the intraperitoneal route, with a suspension of *M. lepraemurium*, containing 5,7 mg, 2,85 mg and 0,57 mg of bacilli, respectively. A part of the injected animals with each dose was treated with DDS (start of the treatment: 7 days after inoculation), and the rest of the animals was left untreated. By means of histological study of the lesions and the animals survival-time, these several groups were compared. The results of the survival-time were analysed statistically (variance analysis and regressive line of the survival). and the following was observed: a) sulfone treatment increases the animals' survival time; b) the survival increases produced by the treatment is independent of the amount of inoculated bacilli; c) the survival time of the untreated animals varies with the dose of the inoculated bacilli: the smaller the dose, the longer the survival time and vice-versa; d) among the untreated animals the relation between the survival-time and the logarithm of the bacillary dose is linear, within the used limits. This permits a biologic assay of the inoculum, of the animals survival-time is know; e) the results of sulfone treatment are as more evident as greater the doses of bacillary inoculum.

Being linear, among the untreated animals, the regression of the dose of inoculum on the survival-time, the rhythm of proliferation of *M. lepraemurium* was calculated from these results; a mean value of 55,1 day was obtained ($\pm 4,1$ for confidence intervals of 5%) showing that this bacillus has a very slow rate of growth.

The results were discussed in respect to the action of DDS in murine leprosy.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — HADLER, W. A. — Rev. Brasil. Leprol. 19: 75, 1951.
- 2 — RADLER, W. A. & MAURI, A. C. — Rev. Brasil. Leprol. 16: 139, 1948.
- 3 — RADLER, W. A. & MAURI, A. C. — Rev. Brasil. Leprol. 16: 191, 1948.
- 4 — RADLER, W. A. & MAURI, A. C. — Internat. J. Leprosy 18: 67, 1950.
- 5 — RADLER, W. A. & ZITI, L. M. — Rev. Brasil. Leprol., 21: 341, 1953.
- 8 — RADLER, W. A. & ZITI, L. M. — Rev. Brasil. Leprol. 24: 56, 1956.
- 7 — MAURI, A. C.; HADLER, W. A. & CARVALHO, C. M. — Rev. Brasil. Leprol. 19: 85, 1951.
- 8 — NAGUIB, M. & ROBSON, J. M. — J. Path. & Bact., 72: 657, 1956.
- 9 — NAGUIB, M., REES, R. J. W. & ROBSON, J. M. — J. Path. & Beet., 71: 409, 1956.

Soma dos progressos na córticoterapia suprarrenal anti-inflamatória, visando a utilização da plena atividade hormonal e levando em conta a sensibilidade individual do paciente.

AMBICORTANCYL

(Prednisona + prednisolona)

Reumatismo articular agudo - Poliartrite crônica evolutiva, Espondiloartrite anquilosante - Artroses, gota aguda e crônica, Periartrite escápulo-humeral - Sinovites, bursites, tenosinovites, Talalgias, ciáticas e nevralgias diversas.

Asma brônquica, enfisema pulmonar - Rinites alérgicas, Dermatoses constitucionais e de contato - Psoríasis, pênfigo, Colagenoses - Anemia hemolítica, ferriprivas, leucoses, Hiperplasia suprarrenal.



VIDRO COM 20 COMPRIMIDOS.

Cada comprimido contém

0,0025 g de prednisona e 0,0025 g de prednisolona.

LABORATÓRIOS SILVA ARAUJO - ROUSSEL S. A.



RIO DE JANEIRO

AMC P.1