

## *Relatório do Instituto de Pesquisas Terapêuticas da Fundação Paulista contra a Lepra \**

Tendo completado dois anos de nossas actividades nestes laboratórios, julgamos de interesse mútuo a apresentação de um relatório do que foi realizado durante esse período.

O início de nossas actividades coincidiu com o do funcionamento dos laboratórios do Instituto de Pesquisas Terapêuticas, de modo que se nos depararam vários problemas iniciais, tais sejam:

1) montagem dos laboratórios, problema difícil tendo-se em vista as dificuldades materiais, aliás do conhecimento de VV. SS., facto este que tomou uma parte de nossas actividades;

2) escolha e preparo de pessoal técnico-auxiliar capacitado, cujo intuito, até o presente, não conseguimos satisfazer, apesar do esforço e substituição de diversos funcionários;

3) montagem de um biotério; a criação de diversas colônias de animais para uso experimental, prendeu nossa especial atenção, tendo-se em vista que os animais usados em laboratórios de pesquisas médicas, representam contingente de grande importância nos resultados finais.

A resolução desses três itens principais tomou toda nossa atenção e grande parte de nosso tempo.

Apesar de tudo, no que se refere ao pessoal técnico-auxiliar, encontramos-nos ainda em fase atrasada e estamos longe de solução satisfatória.

Quanto ao aparelhamento dos laboratórios, conquanto não seja perfeita, já satisfaz as exigências preliminares; o biotério continua a receber nossa atenção e nos parece que pequena reforma material fará com que tenhamos no Instituto de Pesquisas Terapêuticas, um dos bons biotérios do país, no tocante a raças e qualidades de animais.

---

(\*) Relatório publicado pela Fundação Paulista contra a Lepra; apresentado pelos Drs. A. C. MAURI e W. A. HADLER aos Membros do Conselho Administrativo, tendo recebido um voto de louvor pela orientação científica dada às pesquisas realizadas, além da dedicação demonstrada nos trabalhos do Instituto.

Diante destes factos, são patentes as dificuldades que se nos depararam nestes primeiros anos. No entanto, dispendemos todo o nosso esforço no sentido de se contornar esses obstáculos, procurando produzir alguma coisa; este vocábulo "produzir" diz respeito não sômente à publicação e divulgação de trabalhos científicos, como também ao estudo analítico da literatura referente à lepra, pondo-se então em evidência os trabalhos que deveriam ser comprovados, refutados, ou proseguidos.

Logo de início traçamos um programa de estudos experimentais de acordo com as finalidades de nossos laboratórios, que como o próprio nome diz "Instituto de Pesquisas Terapêuticas" deveria relacionar-se com a terapêutica da lepra; ora, um programa elaborado nesse sentido, deve ser extenso e amplo, abrangendo necessariamente o estudo e a possível solução de problemas correlatos, que em si, não dizem respeito propriamente à terapêutica.

Assim, por exemplo, a bacteriologia, a imunidade, a fisio e a anatomopatologia da moléstia, representam capítulos de interesse seja na expliação de possíveis acções terapêuticas, seja na elucidação de fenómenos biológicos que constituem orientação preciosa na escolha de novos agentes.

A bacteriologia, contribuindo com as tentativas de cultura e de inoculação em animais, permiteria observação "in vivo" e em animais de laboratório.

O estudo dos fenómenos imunitários merece e exige, na lepra, grande dedicação, o que aliás se verifica com todas as moléstias infecto-contagiosas, seja pelo seu alcance profiláctico, como pela correlação estreita que apresenta com a terapêutica.

O estudo detalhado da fisio e da anatomopatologia da moléstia, determinando conhecimentos de ampla utilização, representa contingente bastante importante na observação do efeito de agentes quimioterápicos.

Também merece nossa atenção o capítulo da farmacologia geral, porque êle nos fornece dados de grande valor no estudo das acções farmacológicas das novas drogas. Portanto, nosso programa estabelece como ponto capital o estudo da terapêutica, relacionando-a com observações correlatas, que além de esclarecerem a fisiopatologia, fornecem dados de grande valor, aplicáveis directa ou indirectamente à farmacodinâmica das drogas e terapêutica da lepra.

Tendo-se em vista as dificuldades que apresentam o estudo experimental da lepra no homem e a inoculação de seu agente causal nos animais, estamos desenvolvendo nosso programa de estudos partindo principalmente da lepra murina e quando possível, utilizando-nos de material humano.

As afinidades existentes entre a lepra humana e a murina, justificam o seu emprego, como veremos mais adiante.

Baseados nesse programa estamos desenvolvendo os seguintes estudos:

### 3) *BACTERIOLOGIA:*

a) tentativa de inoculação do bacilo de Stefansky e do *Mycobacterium leprae*, em embrião de galinha. A este respeito nossa observação não nos permite até agora concluir ou comentar; as inoculações se acham nas fases iniciais.

b) tentativa de inoculação do *Mycobacterium leprae hominis* em camundongos e ratos. Nosso principal objectivo tem sido seleccionar, por cruzamentos, raças especiais de ratos e camundongos, com a finalidade da possível obtenção de raça ou família susceptível à esse bacilo. Para esse fim partimos de 4 raças diferentes de ratos e 9 de camundongos.

Nos estudos preliminares, tivemos ocasião de verificar que o bacilo de Hansen, quando inoculado em ratos jovens, por via intraperitoneal ou sub-cutânea, provoca no fim de 6 -10 dias, lesões anatomopatológicas evidentes em certos órgãos, cuja estrutura é semelhante à observada quando se inocula o bacilo de Stefansky. No entanto, enquanto as lesões provocadas por este último bacilo, têm evolução constante e progressiva (como veremos na descrição de outros estudos), as provocadas pelo bacilo de Hansen, apresentam fase de evolução progressiva somente até o 15.º - 20.º dia e a partir daí, regridem até o desaparecimento. Essa observação que reputamos importante, está merecendo nossa atenção; assim estamos provocando alterações no organismo dos animais inoculados, quer por carências alimentares, quer pela administração de substâncias de várias ordens, na tentativa de obter-se pelo menos a evolução progressiva das lesões.

### 4) *IMUNIDADE:*

Dentro deste capítulo procuramos estudar a imuno-química, a possível presença e pesquisa de anticorpos, (precipitinas, reáginas, etc.) e a reacção da lepromina experimentalmente praticada em animais.

a) Com relação à imuno-química tivemos ocasião de completar um estudo já publicado, cujo resumo é o seguinte:

Observações clínicas e os resultados da leitura do teste da lepromina serviram de ponto de partida para o estudo bioquímico realizado no presente trabalho.

As diversas referências sobre o comportamento das fracções proteicas, especialmente as globulínicas, foram tomadas como base.

Dosamos, pelo método de fraccionamento pelos sais neutros, as fracções proteicas em 113 crianças, das quais 63 eram lepromino-positivas e 50 lepromino-negativas.

Concluimos que os dados quantitativos médios obtidos, são mais elevados no grupo lepromino-positivo que no lepromino-negativo, especialmente no que se refere às globulinas e destas, às pseudoglobulinas I. O mesmo foi confirmado pelo estudo estatístico em cada fracção isoladamente.

Em diversas moléstias infecciosas, grande número de pesquisadores, utilizando-se de diversos métodos de estudos, assinalam aumento das fracções globulínicas, o qual é relacionado com a presença de anticorpos específicos.

Traçamos um paralelo entre estes resultados e os obtidos em outras moléstias infecciosas. Com os dados apresentados nesse trabalho pudemos apenas estabelecer correlação, chamando atenção para esse ponto, sem no entanto concluirmos pela presença de anticorpos específicos no grupo lepromino-positivo; as diferenças encontradas no estudo comparativo dos grupos lepromino-positivo e negativo, poderiam também estar relacionadas à fracções globulínicas desprovidas de propriedades imunológicas, cuja formação traduziria reacção não específica do organismo.

b) No que se refere à pesquisa de anticorpos circulantes, estamos realizando estudos com o fim de procurar pôr em evidência, nos soros provenientes de indivíduos portadores de lepra nas suas várias modalidades, a presença de precipitinas específicas.

Para isso estamos nos utilizando de uma reacção de precipitação; até o momento nossas dificuldades são de ordem técnica, na preparação dos antígenos, os quais são instáveis, o que por vezes não permite que se execute a reacção. Em face de não termos obtido resultados contraditórios, estamos prosseguindo as pesquisas no sentido de obter estabilização dos antígenos. Essa reacção é altamente sensível e possui especificidade em relação aos soros de doentes portadores de outras moléstias, até agora experimentadas.

c) Como tivemos ocasião de assinalar, estamos estudando a reacção da lepromina em animais.

A reacção da lepromina foi praticada em 118 ratos, os quais foram divididos em grupos conforme veremos posteriormente. Em todos os grupos foi usado sempre um mesmo antígeno, obtido a partir de lepromas de rato, seguindo técnica de Hayashi.

São os seguintes os grupos referidos:

1 — animais normais: em 31 animais normais foi a reacção praticada, tendo-se em todos eles observado a negatividade da mesma;

2 — animais previamente inoculados com bacilos de Stefansky:

a) em 36 animais inoculou-se previamente, pela via peritoneal, bacilos vivos; destes animais, 9 haviam sido esplerectomizados anteriormente e 9 estavam bloqueados antes da inoculação dos bacilos; em todos eles a reacção foi negativa;

b) em 25 animais previamente inoculados com bacilos autoclavados, ou tindalizados, em doses variáveis, a reacção foi também negativa;

3 — animais tratados com Diazona: 5 animais tratados com dose forte de Diazona Abbott, durante 3 meses, apresentaram reacção negativa;

4 — animais inoculados com bacilos de Stefansky e tratados com varias drogas:

a) 8 tratados com Diazona Abbott durante 3 meses, deram reacção negativa;

b) 9 tratados com Diazona Butantan (I<sup>a</sup>) durante 2 meses e meio: reacção negativa;

c) 4 tratados com Rongalite comercial durante 2 meses e meio: reacção negativa.

Deve-se notar que na grande maioria dos animais observou-se a formação de uma pápula com mais ou menos 1,5 mms. de diametro, na região inoculada, desprovida de hiperemia; essa pápula que surge geralmente 24 horas após a inoculação, perdura em certos animais até o 28.º dia. A biopsia, praticada nessa ocasião, mostra um pequeno nódulo histiocitário, cujas células contem em seu interior grande número de bacilos integros e degenerados. Não há qualquer esboço de positividade da reacção, sob o ponto de vista histopatológico, em vista da estrutura assinalada.

Deve-se concluir pela negatividade da reacção em todos os ratos, não se tendo observado influência das sulfonas e da excitação do S.R.E., sobre o resultado da reacção da lepromina.

Estamos tentando a obtenção da lepromino-reacção positiva em ratos, administrando aos animais inoculados com o antígeno, outras substâncias, uma das quais provocou a reactivação de uma reacção praticada previamente e cujo resultado era negativo. Esta observação é bastante recente e carece, neste momento, de daos anatomopatológicos esclarecedores da natureza do nódulo que caracterizou a reacção. Além disso, a lepromino-reacção irá ser estudada em coelhos, cobaias e cães.

## 5) *PATOLOGIA:*

Este capítulo tem sido focalizado pelos patologistas no que se refere a descrição e sistematização das lesões cutâneas, relegando a plano secundário as lesões dos órgãos internos. For esta razão e pelo facto de que essas lesões dos órgãos internos devem representar, a nosso ver, papel importante na patogenia da moléstia, e portanto, directamente relacionado à terapêutica, nossa atenção foi voltada particularmente para esse ponto.

Estando nosso programa de terapêutica principalmente baseado em dados fornecidos por ratos ou camundongos inoculados com bacilos de Stefansky, estudamos preliminarmente a patogenia da lepra murina, nos seus detalhes menos conhecidos; em virtude do interesse científico e ainda mais, pela aplicação imediata na observação de quimioterápicos com possível acção terapêutica na lepra, julgamos de grande valor a continuação desses trabalhos; aliás, a lepra murina foi bastante estudada, porém não sistematicamente, e os dados fisiopatológicos foram completamente relegados a plano secundário.

E' de nossa observação actual; conforme veremos, que esses dados fisiopatológicos fornecem esclarecimentos de grande valor, quanto à patogenia da moléstia:

Em virtude desses factos, não nos limitamos a análise dos quadros morfológicos puros, dando orientação mais dinâmica aos nossos estudos.

A patologia da lepra murina foi estudada detalhadamente nos estadias mais avançados de infecção, não tendo ocorrido o mesmo inicialmente, ou nas fases consecutivas (exceptuando o trabalho de Fite que usando inoculação subcutânea estudou a lepra murina sistematicamente, dando maior importância às fases iniciais, sem entrar em detalhes sobre o aspecto patogênico-evolutivo). Cientes da ausência de dados minuciosos quanto às diferentes fases evolutivas da moléstia quando se faz inoculação intraperitoneal, em ratos, decidiu-se elaborar o estudo progressivo das lesões nos vários órgãos desse animal.

Usamos 265 ratos jovens, variando as idades entre 30 e 50 dias e pertencentes à raça Mac Collum, Wistar e outros provenientes de cruzamentos com *Rattus norvegicus*, com os característicos desta raça.

O material usado para inoculação procedeu de ratos inoculados experimentalmente com diversas passagens; os nódulos subcutâneos foram removidos e juntamente com os órgãos internos ricos em bacilos, triturados e diluídos em solução fisiológica glicerinada a 40%, na proporção de 1:20; o material foi conservado em

geladeira a 4°C. A turvação da suspensão de bacilos corresponde aproximadamente ao do tubo de ensaio n. 5 da escala de Mac Farland. O material foi trabalhado sob condições de esterilidade.

Antes de se fazer a inoculação foi verificada a riqueza em bacilos, da suspensão. A inoculação foi efectuada pela via intraperitoneal em doses únicas de 0,5 cc. por animal. Esta dose variou em alguns grupos. Os animais foram sacrificados diariamente, do 1.º ao 20.º dia, e cada 5 dias até o 180.º dia após a inoculação.

Vamos enumerar rapidamente os achados mais interessantes, que poderão ser ordenados analisando separadamente as alterações encontradas no peritoneo, gânglios linfáticos e alguns outros órgãos como, o fígado, baço, rins e pulmões.

Os bacilos inoculados por via intraperitoneal quando invadem o organismo seguem 3 vias:

I) linfática que os conduz aos gânglios;

II) hemática, atestada pela detenção de bacilos na corrente sanguínea, mais comum entre o 3.º e 10.º dia, à qual dissemina-os por todo o organismo;

III) por contacto, propagando-se aos órgãos abdominais, etc.

As alterações do peritoneo, podem ser divididas em 2 fases. A primeira ocorre na cavidade peritoneal, na qual elementos hemáticos como neutrófilos, linfócitos e alguns monócitos aparecem e são subsequentemente seguidos de elementos reticulo-endoteliais, (macrófagos endoteliais e macrófagos reticulares). O aparecimento de elementos hemáticos precede aos reticulo-endoteliais, decrescendo na proporção do aumento dos últimos, de forma que no 4.º e 5.º dia após a inoculação, os neutrófilos e linfócitos são bem menos numerosos. Os bacilos são encontrados notadamente a princípio nos neutrófilos, e depois então quasi que exclusivamente nos elementos do reticulo-endotelio.

A segunda fase dá-se na intimidade do peritoneo, onde são evidenciadas células leprosas subserosas que se agrupam, aumentam em número e dão origem aos nódulos leprosos. Por volta do 120.º dia podem ser observados tumorações abdominais de tamanhos variáveis, com necrose e dissociação central.

Vinte e quatro horas após a inoculação, nota-se no seio dos ganglios linfáticos do mediastino, áreas onde células endoteliais do seio linfático são mobilizadas e contém um número variável de bacilos no citoplasma. As células leprosas aumentam em número, sempre atingindo áreas maiores da cortical, invadindo os linfáticos radiais e apresentando forma irregular.

Do 5.º e 6.º dia em diante, a infiltração leprosa toma uma forma arredondada formando lesões nodulares, contendo um grande número de bacilos.

Até o 45.º e 50.º dia, não se observam alterações notáveis no aspecto anterior, sendo observado somente um decrescimento de bacilos no 15.º dia, que alcança um mínimo entre o 30.º e 40.º dia.

Depois do 45.º dia as lesões nodulares aumentam progressivamente de tamanho fundindo-se umas com as outras — aspecto do 60.º e 70.º dia —, tendo aumentado o número de bacilos. Por volta do 115.º dia pode haver necrose nos nódulos maiores. Depois do 180º dia a capsula do gânglio e tecidos vizinhos podem ser comprometidos.

No fígado, do 10.º dia em diante é aparente o entumescimento das células de Kupffer, contendo bacilos no citoplasma.

No 20.º dia há infiltração de células linfóides, sem bacilos, ao redor dos vasos sanguíneos áreas interlobulares e veias centrolobulares; entre o 20.º e 25.º dia encontram-se nestas infiltrações alguns histiocitos contendo bacilos. Estas células aumentam em número constituindo nódulos leprosos, após o 25.º dia. Até o 80.º e 110º dia não há alterações no quadro acima descrito. A partir daí, os nódulos crescem e se observam necrose e supuração. O revestimento peritoneal do fígado e baço podem apresentar lesões da capsula.

De 1 a 3 dias depois da inoculação o endotélio dos seios venenosos e células reticulares da polpa vermelha do baço apresentam bacilos no seu interior. Não há alteração na estrutura do órgão. Após o 20.º dia os primeiros grupos de células leprosas se manifestam e aumentam em número. Pelo 30.º dia encontram-se nódulos leprosos na polpa branca e vermelha do baço. O número de bacilos nos nódulos não é grande. As lesões chegando a esta fase tornam-se estacionárias.

No rim, até o 180.º dia não se encontram lesões; notam-se apenas algumas infiltrações leprosas na capsula e no tecido gorduroso perirenal.

No pulmão, desde o 3º dia há bacilos nas células dos capilares endoteliais. Após o 30.º dia observa-se proliferação das células adventíciais dos vasos sanguíneos e dos pequenos foliculos linfáticos dos bronquios. Após o 60.º dia ocorrem as primeiras infiltrações perivascularares de células leprosas, que formam nódulos, (cerca do 120.º dia) . Proximo ao 100.º dia há infiltração leprosa sem relação com os vasos sanguíneos.

A inoculação peritoneal origina infecção generalizada, com evolução progressiva, com lesões típicas e características, sem tendência à regressão espontânea. E' sob este aspecto, que foi baseado nosso trabalho para o controle de drogas antilepróticas. Desta forma a evolução das lesões é observada sob a acção do tratamento,



podendo denotar a acção terapêutica — bacteriostática ou bacteriolítica. Além disso, as experiências são feitas em animais jovens com reservas de defesa ainda não esgotadas e com lesões recentes bem vascularizadas.

Estamos também fazendo observações em animais inoculados com uma amostra de bacilos primitivamente isolados, por Badger, de camundongos naturalmente infectados; esta amostra foi por nós trazida dos Estados Unidos da América do Norte, recentemente.

Constituindo assunto de controvérsia a correlação entre a lepra humana e a murina, julgamos de interesse a análise deste capítulo; aliás, já fizemos algumas referências a estes estudos quando tratamos da inoculação do bacilo de Hansen em animais. Nossas observações, sob esse ponto de vista, abrangem também o estudo comparativo da histopatologia da lepra humana e murina.

#### 6) *FISIOPATOLOGIA:*

Neste capítulo poderiam ser enquadrados vários assuntos; neste breve relatório, porém, nos limitaremos a descrever as experimentações que estão em fase mais adiantada.

Constituindo um dos capítulos de nosso programa a tentativa de inoculação do bacilo de Hansen em animais e representando o mesenquima o contingente tissular primordial na patogenia da lepra (murina e humana), nossa atenção foi voltada para o sistema retículo-endotelial.

Um dos nossos estudos actuais versa sobre a acção de substâncias bloqueantes do sistema retículo-endotelial sobre a evolução da lepra murina; o interesse fisiopatológico deste problema reside na aplicação dos dados obtidos, na tentativa de inoculação de animais com o bacilo de Hansen.

Toda vez que se bloqueia o S.R.E. de um animal, no qual, após isso introduz-se um agente patogénico, a moléstia evolue mais rapidamente e assume maior gravidade.

A esplenectomia age no mesmo sentido. Assim, por exemplo, nos ratos esplenectomizados é comum surgir uma infecção por *Bartonella muris*, infecção essa espontânea e que leva o animal à morte: esse facto não se verifica com animais não esplenectomizados que podem servir de testemunhos.

Ora, na lepra murina dá-se justamente o inverso, isto é, o bloqueio do S.R.E. dificulta visivelmente a evolução da moléstia. Os nódulos leprosoes se formam em menor número, são de menores dimensões e contêm bacilos em menor quantidade. Além disso, a

evolução dos nódulos é nesse caso tórpida, o que se pode verificar facilmente comparando o quadro histopatológico dos animais bloqueados com os normais, ou melhor, não bloqueados.

Por outro lado, a injeção de corantes ácidos (Azul de Tripán) em dose pequena, de modo a provocar uma excitação do S.R.E. sem bloqueá-lo, determina o inverso. A lepra murina assume então evolução exuberante, formando-se nódulos de grande tamanho em todos os órgãos; a tendência da moléstia é evoluir com maior rapidez que nos animais testemunhos.

Esse facto vem demonstrar que a lepra murina não se comporta como a generalidade das moléstias microbianas. Tudo faz crer que o bacilo de Stefansky necessite das células do S.R.E. para seu metabolismo, apresentando um parasitismo estrito a essas células. O estudo histopatológico da lepra murina evidencia com clareza a estreita relação entre a célula reticular e os bacilos, tanto no aparecimento das lesões, como na sua progressão.

Constitue argumento a esse favor o facto de não se conseguir cultivar o bacilo da lepra murina nos meios de cultura comuns ou enriquecidos.

De acordo com os factos mencionados somos levados a pensar que toda substância capaz de ser fixada pelas células reticulares, de modo a bloquearem-nas e por conseguinte inibirem sua acção quimiotáctica ou fagocítica, teriam a propriedade de dificultar a evolução da lepra murina. E' o que de facto tivemos ocasião de verificar pela observação continua e seriada dos nossos animais.

Esses pontos apresentam importância tanto no que concerne à patogenia da lepra murina, como ao seu tratamento. E' claro que se conseguirmos uma substância que ao lado de propriedades bacteriostáticas ou bacteriolíticas, possua também acção bloqueante do S.R.E., essa substância deverá apresentar actividade terapêutica bastante intensa, muito mais intensa que as drogas possuidoras de unicamente uma dessas duas propriedades.

Estando também nossa atenção voltada para o tratamento experimental da lepra murina, pelas razões já apontadas, usando-se drogas com possível acção sobre o bacilo (bacteriostática ou bacteriolítica), julgamos de grande importância o conhecimento do ciclo de regressão das lesões e a eliminação dos bacilos, quando submetidos à acção de um quimioterápico realmente eficiente.

Para este fim, injectamos em animais bacilos previamente mortos pelo calor, porém íntegros. Da análise sistemática dos animais inoculados, pudemos observar todas as fases evolutivas das lesões provocadas. O estudo comparativo dessas lesões, em relação com as produzidas pelos bacilos vivos, demonstrou estreito paralelismo nas fases iniciais. Após esse período, enquanto as le-

sões provocadas pelos bacilos vivos tendem à evolução progressiva, as provocadas pelos mortos, a princípio estacionam e posteriormente regridem vagarosamente. Estes dados permitem traçar um paralelo entre as lesões provocadas por bacilos mortos e as que se observam quando se injecta em animais o bacilo de Hansen; há, porém, alguns detalhes morfológicos que estão sendo estudados.

##### 5) TERAPÊUTICA:

A principal finalidade de nossos laboratórios tem sido o estudo da terapêutica experimental da lepra.

Não é de nossa alçada a síntese e obtenção de novas drogas com possível acção antileprótica; aliás, esse capítulo está sendo desenvolvido por uma equipe de químicos especializados, no Instituto Butantã, de comum acordo com a directoria do D.P. L..

Uma vez preparados os produtos quimioterapicos novos, são eles enviados aos nossos laboratorios para o controle experimental e respectivos estudos farmacologicos.

A directoria do D.P.L. nos consultou sobre as possibilidades desses estudos.

Em vista de termos nosso programa de acção já elaborado e em fase de desenvolvimento prático, aceitamos essa incumbência.

Baseados em nossa experimentação, achamos que a única via realmente científica, eficiente, e prática seria a utilização da lepra murina. Aliás, a esse respeito tivemos a satisfação de ver nossa técnica ratificada pelas opiniões de abalizados técnicos e estudiosos do assunto, durante nossa viagem aos EE. UU. Um deles, Fite, assim se expressou. em impressões que recebemos por carta:

"... None the less, we still believe the rat leprosy to be a suitable subject for drug testing."

Utilizando-nos, portanto, da lepra murina para o controle terapêutico-experimental de quimioterápicos com possível acção antileprótica, fizemos estudos com várias destas drogas, o que passamos a relatar.

A falta de cultura do *M. leprae hominis* e a ausência de um animal sensível a este microorganismo, torna difícil o controle de drogas em experimentação. Este obstáculo pode ser vencido pelo emprego de *M. leprae muris*, submetido a acção das mencionadas drogas. Muitos autores têm trabalhado neste assunto. Empregaram diversos métodos tratando animais em fases avançadas da

evolução, no início da mesma, ou determinando a acção das drogas "in vitro", e inoculando bacilos assim tratados em ratos.

O efeito terapêutico é atribuído à redução no tamanho dos lepromas, ou à sua ulceração; ao comportamento da moléstia em evolução quando o animal, ou os bacilos, são submetidos à acção das drogas.

Sendo o controle experimental de drogas responsáveis pela acção antileprótica, assunto de interesse e em vista do crescente número de novos medicamentos fornecidos pelos químicos do Instituto Butantã — Srs. Berti, Rieckmann, Perego e Rzeppa — decidiu-se o estudo que fazemos.

Não há um método padrão estabelecido que permita verificação exata da acção terapêutica contra a lepra, no laboratório. Baseados nas pesquisas apresentadas no trabalho anterior, foi delineado um método de estudo.

Iniciou-se o tratamento quando se manifestaram os primeiros nódulos nos gânglios linfáticos (5.º — 6.º dia após a inoculação), e a observação do animal tratou-se durante a evolução da moléstia.

Os animais foram inoculados da mesma maneira e as doses de bacilos foram as empregadas precedentemente.

As experiências foram feitas com as seguintes drogas:

1. "Diasona" Abbott
2. p,p'-diamino-difenilsulfona-bis-metilsulfoxilato de sódio, em alto grau de pureza, obtido por condensação de p,p'-diamino-difenilsulfona-recristalizado em etanol ao ponto de fusão constante — com Rongalite, obtida por redução com zinco em pó, de uma solução aquosa de bisulfito de sódio e formaldeído, que titulado iodometricamente acusou 100,8% em formaldeído-sulfoxilato de sódio. A condensação foi feita segundo as indicações de Bauer (Am. Ch. Soc. 61:617, 1939). O produto assim obtido foi analisado, acusando: Nitrogênio: calculado - 5,78%; encontrado - 5,9 a 6% Sódio: calculado - 9,50%; encontrado - 9,1 a 9,23%.
3. Rongalite comercial que iodometricamente analisada acusou 83,7% de formaldeído-sulfoxilato de sódio e 13,7% de água.
4. Rongalite purificada (R5); para sua obtenção o produto comercial foi recristalizado em atmosfera de água-

nitrogênio; sua análise iodométrica demonstrou 97,8% em formaldeído-sulfoxilato de sódio e 26,3% de água.

5. Nitrilometilensulfoxilato de sódio (R144) obtido por intermédio das indicações da patente alemã n. 216.074, de bi-sulfito de sódio, formaldeído e amoníaco, sendo a redução executada com zinco em pó.

As quatro últimas drogas foram preparadas e fornecidas pelos referidos químicos do Instituto Butantã.

Os animais sob tratamento receberam duas doses da droga, diariamente, por via peritoneal; a dieta foi acrescida de 0,5% destas substancias. A medida que os animais ganhavam peso, aumentavam-se as doses; foram estas, todavia, sempre mais elevadas que as empregadas no homem.

### *Resultados.*

1. "Diasona" Abbott

Dose inicial: 0.167 gm./kgm. de peso; depois de 40 dias de tratamento; 0.250 gm./kgm. de peso; depois de 60 dias de tratamento: 0.330 gm./kgm. de peso.

Deve-se observar que a dose aplicada para o homem é de 0,016 gm./kgm. de peso, ao passo que a aplicada nos animais corresponde a 10-20 vezes mais, em relação ao peso corporal.

Depois de um tratamento de 5 meses, evidenciou-se através do estudo citológico, bacterioscópico e histológico, que esta droga não teve efeito na lepra murina experimental.

2. p,p' - diamino-difenil sulfona-bis-metilensulfoxilato de sódio em elevado grau de pureza; dose inicial: 0.167gm./kgm. de peso; depois de 40 dias e durante todo o tratamento: 0.200 gm./kgm. de peso.

Esta proporção é menor do que a de "Diasona" Abbott; além disso, não foi administrada oralmente, si bem que seja duas vezes menos tóxico que a "Diasona" Abbott.

O tratamento foi cuidadosamente observado durante 4 meses; no terceiro mês as lesões mostraram-se menos evoluídas do que nos ratos testemunhos; alterou-se a morfologia dos bacilos e formas granulosas foram frequentemente observadas. Depois de um tratamento de 4 meses os nódulos leproso dos gânglios linfáticos e de outros órgãos reduzem de tamanho, contendo pequeno numero de bacilos, a maioria dos quais apresenta aspecto granuloso,

Não se conseguiu cura histológica das lesões durante tratamento de 4 meses.

3. Rongalite comercial e purificada.

As doses iniciais e subsequentes foram as mesmas das de "Diasona" Abbott.

Os animais sob tratamento ficaram em observação durante 4 meses; os resultados obtidos não contribuíram nem para melhorar o aspecto das lesões, nem para impedir a evolução das mesmas.

4. Nitrilo-metilen-sulfoxilato de sódio.

Esta droga tem toxicidade elevada.

Dose inicial: 0,150 gm./kgm. de peso. Depois de um tratamento de 40 dias: 0.250 gm./kgm. de peso.

A observação foi mantida durante três meses de tratamento, e revelou que a droga não interfere no curso evolutivo da moléstia.

Finalmente concluiu-se que o tratamento experimental da lepra murina provou o seguinte:

a) "diasona" Abbott não deu nenhum resultado durante todos os 5 meses de tratamento, mesmo com o emprego de doses elevadas.

A moléstia evoluiu gradativamente sem sintomas que indicas sem melhora ou regressão.

b) os resultados conseguidos com as Rongalites comercial e purificadas foram nulos, sem produzir alteração alguma no curso, da moléstia.

c) o mesmo deve ser dito quanto ao nitrilo-metilen-sulfoxi, lato de sódio.

d) o tratamento de 4 meses com o p,p' - diaminodifenil-sulfona-bis-metilensulfoxilato de sodio evidenciou alterações no curso da molestia. Dois fenômenos mereceram atenção. O primeiro, foi o retardamento da evolução das lesões, que em animais submetidos ao tratamento foi evidentemente nitido em relação aos respectivos animais testemunhos; o segundo consistiu nas alterações morfológicas que se observaram nos bacilos, os quais, na sua maioria não apresentam aspecto típico; uma grande porção tinha aspecto fragmentado ou granuloso, sendo numerosas as granulações acido-resistentes. A acido-resistência dos bacilos e granulações está dminuida. Os nódulos leproso, todos de tamanho reduzido, são constituídos de células de núcleo mais vesiculoso e citoplasma maior do que as dos animais testemunhos.

Chamamos a atenção para o facto de que os resultados acima referem-se exclusivamente a terapêutica da lepra murina; por falta de dados mais objectivos não se pretende traçar paralelo entre a lepra humana e murina.

A applicabilidade desse método para o controle de novas drogas antileproticas não é refutada pelos factos demonstrados acima.

Nossas observações continuam e no momento actual podemos acrescentar novos e mais detalhados dados sobre os efeitos terapêuticos das drogas referidas, assim como observações sobre outros medicamentos, os quais são os seguintes: Promin, T.T.F., A. M. C.13 H, Promacetin, Promizole, Diamidin, Pamizyl, Diamino-difenil-sulfona e derivados chaulmoogricos.

Destas drogas, algumas nos foram fornecidas directamente pelos laboratórios de Investigação da Parke Davis e Cia.; durante nossa visita à essa instituição, expusemos o nosso método, que foi bem recebido pelos seus técnicos especializados no controle terapêutico de drogas, por êles fabricadas.

O mesmo interesse quanto ao nosso método foi demonstrado pelos técnicos dos "Abbott Laboratórios", que também nos ofereceram drogas para estudo.

Uma das substâncias acima referida, A. M. C .13 H. foi preparada pelos técnicos do Instituto Butantã, segundo nossa sugestão, baseada em dados obtidos pelas observações no terreno da fisiopatologia.

## 7) FARMACOLOGIA:

Este capítulo que apresenta relações bastante estreitas com a terapêutica tem recebido de nós grande atenção.

Constitue ele uma parte obrigatória de nossas investigações, em virtude da utilização de drogas recém-preparadas, pois somos forçados também a averiguar suas acções tóxicas e determinar seus efeitos gerais sobre os vários sistemas.

Além disso, o estudo farmacológico dessas drogas nos permite conhecer com maiores detalhes certas acções terapêuticas, podendo ainda fornecer indirectamente, esclarecimentos acerca da fisiopatologia dos tecidos infectados.

Tivemos ocasião de fazer um estudo farmacológico do óleo de sapucainnha e de seus ésteres eticos e benzílicos, em colaboração com o Dr. C. E. Corbett.

Dentro de um plano geral traçado, escolhemos para o inicio de nossa experimentação, a observação do comportamento do ca-

mondongo e do rato quando se lhes administra o óleo de sapucainha, ou seus ésteres etílicos e benzílicos.

Os animais de experiência usados provieram de criações controladas por nós mesmos, nos quais, visamos provocar intoxicações agudas ou crônicas.

Com o óleo de sapucainha injectamos camondongos pela via intra-peritoneal, estabelecendo-se que a quantidade de 0,3 cc. causa a morte de todos os animais experimentados. A redução da dose para 0,1 cc. e 0,05 cc. permite não só a sobrevivência de todos os animais, como também a conservação do peso inicial. Porém, a repetição da dose de 0,1 cc., com intervalo de 8 dias, determina a morte dos animais em observação.

Utilizando-se dos ésteres etílicos e benzílicos, injectados por via sub-cutânea ou intra-peritoneal, tivemos ocasião de verificar maior tolerância para os primeiros. Afóra alterações tissulares, no sub-cutâneo ou no peritoneo, foi também possível comprovar-se certa variabilidade na absorção dessas drogas. De modo geral, a absorção através do peritoneo se processa mais facilmente nos camondongos que nos ratos, aparecendo nestes últimos, peritonite acompanhada de retenção de liquido na cavidade peritoneal.

No decorrer de nossas observações verificamos a intoxicação aguda pelos referidos ésteres, tanto em camondongos como em ratos. Nos camondongos doses de 0,2 cc. determinaram a morte da maior parte dos animais, utilizando-se a via peritoneal. Reduzindo a dose para 0,15 cc., enquanto os ésteres benzílicos geralmente mataram os animais com uma única dose, os etílicos apenas causaram a morte quando a dose inicial foi repetida duas ou quatro vezes. A medida que diminuimos as doses dos ésteres, nestas condições experimentais, mais se evidenciaram as diferenças da toxicidade entre eles. Temos a impressão que a dose limiar para estudos desta natureza, em camondongos, está entre 0,05 e 0,10cc., através do peritoneo.

Os ratos injectados por via peritoneal também toleram muito melhor os ésteres etílicos que os benzílicos. A D.M.M. dos ésteres etílicos é aproximadamente de 10 cc. e a dos benzílicos de 5 cc., considerando-se animais com peso médio de 200 gm.

O estudo da intoxicação crônica revela que são necessárias maiores doses de ésteres etílicos, em relação aos benzílicos, para se observar comprometimento do estado geral do animal, quando estas drogas são empregadas em condições experimentais semelhantes.

A análise das alterações anatomopatológicas denota, na intoxicação aguda, lesões predominantemente nos rins, fígado e cora-



ção, não constantes e de tipo degenerativo. Na intoxicação crônica as lesões são também inconstantes, sendo atingidos o fígado, pulmões e baço; apresentam-se com tipo degenerativo, ou hiperplástico. Predominam as lesões degenerativas quando são usados os ésteres benzílicos, ao passo que as lesões proliferativas são mais acentuadas com o uso dos ésteres etílicos. Merece destaque a influência estimuladora destes últimos sobre o S.R.E.

Para o lado do sangue, sempre observamos leucocitose acompanhada de neutrofilia, monocitose e, às vezes, eosinofilia absoluta.

As alterações anatomopatológicas e hematológicas são praticamente as mesmas, quer usando-se a via sub-cutânea, quer a intra-peritoneal.

Durante nossos estudos sobre a possível acção terapêutica do Promin na lepra murina e algumas de suas acções farmacológicas sobre órgãos e sistemas, do rato, verificamos que os animais injectados com esse medicamento denotam solicitação do S.R.E.. Essa solicitação foi verificada e analisada sob o ponto de vista morfológico, tomando-se como base os dados hematológicos (sangue periférico e medula óssea) e histopatológicos, estes últimos referentes aos órgãos ricos em tecido reticular (gânglios linfáticos, baço, fígado e medula óssea). Os dados assinalados são exclusivamente morfológicos e se bem que estejam relacionados com as alterações funcionais do sistema, tal relação não é muito estreita. Essa ressalva deve ser feita desde o início.

A avaliação das alterações do sistema reticular feita dessa maneira, é falha, até certo ponto, no que diz respeito a sua intensidade; isto é, não se consegue obter uma avaliação quantitativa da alteração, a não ser de modo grosseiro. Apesar de tudo, é esse o único método utilizável morfológicamente para o estudo do S.R.E.

Analizamos os animais injectados com o Promin, sob esse ponto de vista, tendo-se verificado que eles apresentam excitação moderada do sistema reticular. Porém, o Promin. é hemolítico, de modo que a excitação verificada poderia ter duas explicações: ou ser devido ao efeito directo da droga sobre o sistema reticular, ou ser indirecta e nesse caso depender dos efeitos da hemólise sobre o mesmo sistema.

E' claro que a hemólise determina nos organismos capazes de a ela reagirem, além de hiperactividade eritropoiética, aumento do metabolismo da hemoglobina e da eritrocaterése. Ora, a hiperactividade eritropoiética determina solicitação do S.R.E., orientada para a hematopoiése; do mesmo modo, a eritrocaterése e o hiper-

metabolismo da hemoglobina solicitam e determinam a proliferação do sistema reticular, com o fim de captar e destruir as hemácias alteradas e reter os productos do metabolismo activado da hemoglobina. A proliferação do S. R. E. , nesses casos, é passível de ser demonstrada morfológicamente.

Resta analisar os factos com o fim de verificar se a acção do Promin sobre o S. R. E. é primitiva, ou secundária, neste caso advindo dos fenómenos da hemólise.

O estudo hematológico dos animais injectados com o referido medicamento revela que a solicitação do sistema reticular é directamente proporcional à porcentagem de reticulocitos, o que equivale a dizer, grosso modo, que essa solicitação é directamente proporcional à hemólise. Esse facto nos leva a admitir que a solicitação do sistema histiocitário, no caso em questão, está ligada aos fenómenos da hemólise e não directamente à droga.

Aliás, as mesmas considerações podem ser repetidas para a Diasona, em face de nossa observação.

Somos então levados a admitir que a influência das Sulfonas sobre o S.R.E. é indirecta e se faz através da hemólise.

Deve-se lembrar que a hiperplasia do sistema histiocitário dos animais sob a acção das Sulfonas, é visivelmente menor que a dos animais injectados com corantes vitais (azul de tripan).

Conforme foi dito mais acima, um dos quimioterápicos em estudo é o Promin. A literatura referente às suas acções tóxicas é vasta, porém se nos apresentaram durante os testes terapêuticos, problemas que exigiram solução, tais sejam a acção directa do medicamento sobre órgãos e sistemas importantes à economia do organismo; diga-se de passagem que estas acções também foram verificadas no homem, haja visto as modificações que provocam no quadro hemático periférico. Baseados em dados da literatura e em nossas observações, ao mesmo tempo em que se estudou a possível acção quimioterápica desse medicamento, fizemos ensaios sobre efeitos tóxicos crónicos nos nossos animais. De uma maneira geral nossa observação se fixa mais sobre a curva de crescimento de animais jovens sob acção da droga, na influência da mesma sobre os órgãos de secreção interna, (em especial sobre a tireoide) e sobre o quadro hemático periférico e órgãos hematopoiéticos.

A administração do Promin à animais jovens (com cerca de 30 dias de idade) determina, logo no inicio, um ligeiro retardamento do crescimento, em comparação com os testemunhos respectivos.

O peso e o comprimento dos animais submetidos à acção da droga permanecem mais baixos, durante todo o tempo de administração.

Os órgãos de secreção interna examinados revelam: os testículos, prostata e vesículas seminais com tamanho e peso sub-normais; ovários com alterações microscópicas e provavelmente funcionais (retardamento da abertura do ostio vaginal).

A hipófise apresenta também modificações na estrutura microscópica com alteração evidente na contagem das suas células.

A tireóide denota peso menor com alterações estruturais das vesículas, de tamanho pequeno e revestidas por células mais altas. Existe uma fluidificação da substância colóide, com afinidade de coloração diminuída.

O metabolismo basal dos animais, determinado pelo consumo de oxigênio, apresenta alterações.

Quanto ao quadro hemático periférico, podemos resumir assim os nossos achados: anemia discreta do tipo hemolítico com reacção compensatoria dos órgãos hematopoiéticos (aumento da taxa dos reticulócitos, etc.) , ligeira leucocitose e pequenas alterações tóxico-degenerativas da série neutrófila.

O mielograma dos animais revela um aumento percentual da série eritroblastica, com redução relativa dos outros elementos, excepção feita aos elementos do retículo que se apresentam em numero percentual aumentado.

Todas as alterações hemáticas estão directa ou indirectamente relacionadas com os fenómenos hemolíticos; o baço é também influenciado por essa causa e apresenta-se hipertrofiado, congesto e com hiperplasia da polpa vermelha.

A intensidade das alterações encontradas nos animais submetidos à acção do Promin, está, de maneira geral, em relação com às doses empregadas.

Durante esse período, procuramos colaborar de acordo com nossas possibilidades, às reuniões científicas sobre lepra que se realizaram nessa época. Deve-se destacar, no entanto, pelo importante cabedal de conhecimentos que nos trouxe, nossa contribuição à 2.<sup>a</sup> Conferência Panamericana de Lepra, realizada em outubro de 1946, na cidade do Rio de Janeiro, ao V Congresso Internacional de Lepra, realizado em abril de 1948 na cidade de Havana, Cuba e ao IV Congresso Internacional de Moléstias Tropicais, realizado em maio do mesmo ano, em Washington, D.C., U.S.A.

Neste mesmo ano, fizemos uma viagem pelos principais centros de investigação médica dos E.U. e Canadá, realizando estágios em vários laboratórios de pesquisas; estes foram de grande valor para nós, não somente do ponto de vista científico, como também de intercambio cultural com os pesquisadores estrangeiros.

Dos estudos assinalados acima, alguns se acham publicados, outros foram apresentados como nossas contribuições aos congressos de que participamos, outros se acham prontos para publicação e alguns ainda em fase mais ou menos adiantada de elaboração.

Quer nos parecer que o programa assim traçado deverá ser tomado como norma para os estudos que estamos fazendo; aliás, esse programa, foi favoravelmente comentado por pesquisadores norte-americanos e canadenses, a quem tivemos oportunidade de expôr.

Na realidade, é êle bastante extenso e compreende vários capítulos, o que exigiria uma equipe constituída por especialistas para que seu desenvolvimento fosse mais rápido.

Julgamos, no entanto, que nosso maior problema reside na inexistência de auxiliares técnicos, o que exige uma rápida solução e está em directa dependência dessa Directoria.

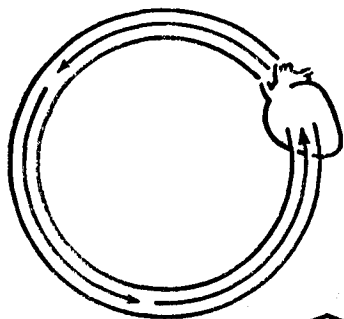
Não poderíamos, no entanto, deixar de assinalar o esforço e dedicação de nossos funcionarios, aos quais expressamos nossos agradecimentos.

A exposição deste relatório tem por finalidade colocarVV. SS. ao par de nosso programa e de nossas actividades até a presente data, nos laboratóriós do Instituto de Pesquisas Terapêuticas desta Fundação.

São Paulo, 18 de agozo de 1948.

(a). **A. C. MAURI**

(o). **W. A. HADLER**



# CORAMINA



**Analéptico  
cardio-respiratório  
hidrosolúvel**

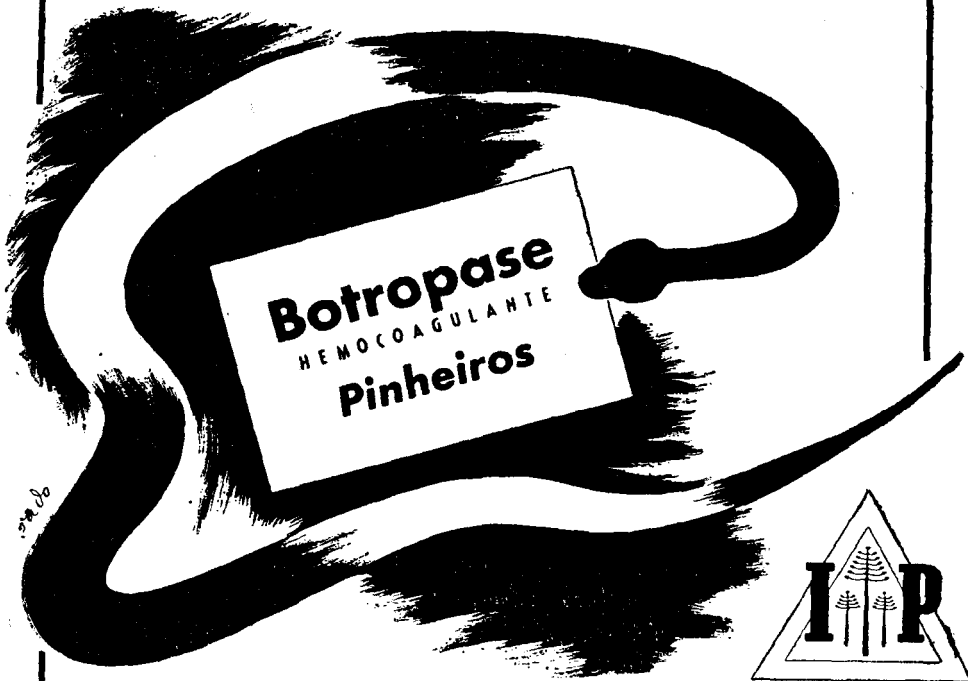
de acção pronta e eficaz em  
todos os casos em que se  
altera o equilíbrio do apare-  
lho circulatório, como p. ex.

**Colapsos - Insuficiência cardíaca e  
circulatória - Doenças infecciosas - In-  
toxicacões - Incidentes da narcose, etc.**

Ampolas de 1,7 e 5,5 cc. Gotas.



**PRODUCTOS CHIMICOS CIBA S. A.  
Rio de Janeiro - São Paulo - Recife**



**Botropase**  
HEMOCOAGULANTE  
**Pinheiros**

