

QUIMIOTERAPIA DA LEPRO

I — Ação do 4,4'-diamino-difenil-sulfona na lepra murina

A.C. MAURI *

W.A. HADLER*

C.M. CARVALHO*

Em 1908, durante estudos com corantes, From e Wittmann ¹⁴ sintetizaram o 4,4'-diamino-difenil-sulfona **. Somente em 1937, Buttle ² e colaboradores demonstraram a atividade anti-bacteriana dessa substância na infecção estreptocócica do camundongo. Nesse mesmo ano, a equipe de Fourneau ¹³ evidenciou ação idêntica. Em 1939, Rist ²⁹ demonstrou que a sulfona mãe inibe a multiplicação *in vitro*, de bacilos tuberculosos humanos, aviário e bovino. Em 1940, esse mesmo A., em colaboração com Bloch e Hammon ³⁰, estudando a ação do DDS sobre a evolução de lesões tuberculosas de cobaias e coelhos, revelou efeito inibidor da substância sobre a evolução da moléstia. Em 1942, Smith, Emmarth e Westfall ³¹ observaram que dentre uma série grande de compostos, o DDS é o que possui ação anti-tuberculosa mais evidente. Feldman, Hinshaw e Moses ¹⁰, em 1914, administraram a cobaias inoculadas com bacilos tuberculosos, 0,15 gramas por dia, *per os*, de DDS; os animais assim tratados apresentaram lesões bem mais discretas que os controles. Seus resultados foram mais nítidos quando, em outra série de animais, prolongaram a experiência por mais tempo, sendo a mortalidade inferior a 30%.

Em 1948 surge na literatura a primeira referência sobre o emprêgo do DDS no tratamento da lepra humana, por Cochrane ⁶: embora referindo somente a utilização da substância por via parenteral e não dando resultados definitivos, o A. evidenciou melhoras clínicas consideráveis. Ésse mesmo A., em colaboração com Ramanujan, Paul e Russell⁷, aplicando o DDS em doentes de lepra, por via intramuscular, considerou-o como medicação mais eficaz na lepra; entre nós, em 1949, Berti, Rieckmann, Peregó e Rzeppa ¹ sintetizaram o DDS. Souza Lima ³² iniciou seus ensaios com essa substância em junho de 1948, tratando 46 casos lepromatosos com 0,3 gramas diárias por via oral; após 15 meses de observação relatou, em nota prévia, grande atividade terapêutica. Mauri & Hadler ²⁴ (nota prévia), empregando a mesma substância no tratamento da lepra murina experimental, verificaram ação sobre a moléstia e alterações na morfologia

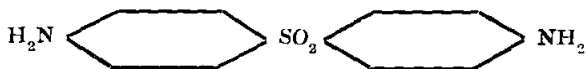
* Serviço de Pesquisas Científicas do Departamento de Profilaxia da Lepra (Secção de Patologia Experimental), e da Fundação Paulista Contra a Lepra, São Paulo, Brasil.

** No decorrer do trabalho será empregada, indiferentemente, a denominação 4,4'-diamino-difenil-sulfona ou a abreviação DDS.

bacilar, após 8 meses de administração de doses diárias médias de 0,040 gramas por via bucal (método droga-dieta).

Em outro trabalho publicado ainda em 1919, Lowe & Smith²³, trataram 54 doentes de lepra com DDS (dose de 0,30 gramas por via oral) ; nos casos tuberculóides e lepromatosos a resposta terapêutica é mais rápida do que a obtida com seus derivados. Empregando o DDS em suspensão oleosa a 20%, Mollesworth, Narayanaswani & Simpson²⁶ publicaram em 1949, o resultado do tratamento de 100 casos de lepra, obtendo melhoras clínicas em 96 e bacteriológicas em 27. Floch & Destombes¹² publicaram, ainda nesse ano, os resultados do emprego do DDS, concluindo que não foram inferiores aos dos outros AA. e deles mesmo, com os derivados. Em 1950, Muir²⁷ publicou os resultados do emprêgo do DDS, em 94 doentes, concluindo que foram obtidas melhoras consideráveis em 48% de 50 casos tratados por mais de 9 meses. Para esse A., o DDS é tão eficaz no tratamento da lepra quanto seus derivados conhecidos e anteriormente empregados.

O 4,4'-diamino-difenil-sulfona, ou bis (4-aminofenil) sulfona



possui toxicidade elevada, tendo sido mais empregados clinicamente os seus derivados N-substituídos do que a própria substância mãe. Segundo Northey²⁸, pode-se supor que a atividade desses derivados N-substituídos esteja ligada à liberação de DDS por processos catabólicos no hospedeiro; a comprovação desse fato reside na atividade reduzida desses compostos, *in vitro*, no achado de amino-grupo diazotizável no sangue no decurso da administração das substâncias e no fato de que nenhum desses N-derivados demonstrou atividade maior do que o 4,4'-diamino-difenil-sulfona, em diversas moléstias.

A análise da atividade quimioterápica de uma substância, somente pode ser feita estudando-se em animais sua capacidade paralisadora na evolução de moléstia induzida que se demonstrou existir antes de instituir-se o tratamento (Karlson e Feldman²²). Não sendo possível até o momento a obtenção de animais suscetíveis ao *M. leprae*, nos quais tivessem sido evidenciadas lesões de caráter progressivo, Hadler & Mauri¹⁷ propuseram o emprêgo da lepra murina como teste de controle experimental de compostos com possível atividade quimioterápica. Esses AA. deixaram bem claro que os resultados obtidos com o emprêgo de substâncias na lepra murina, podem não ser totalmente comparáveis aos obtidos na lepra humana, porém eventualmente correlacionados ou superpostos. O tipo de moléstia induzida, no rato inoculado com o *M. lepraemurium*, oferece ótimas condições para testar a eficácia de agentes quimioterápicos contra bacilos intracelulares dos nódulos lepróticos progressivos.

Obtivemos algumas referências com respeito ao tratamento da lepra murina com derivados do 4,4'-diamino-difenil-sulfona^{3,4,8}; no entanto, não

conhecemos qualquer indicação bibliográfica quanto ao emprêgo do DDS, exceto a nota prévia de Mauri & Hadler ²⁴, publicada em 1949.

O presente estudo, iniciado em novembro de 1948, conjuntamente com uma série grande de substâncias, teve como finalidade a análise da atividade quimioterápica dessas drogas na lepra do rato, constituindo esta publicação a primeira contendo resultados mais completos obtidos com o emprêgo do 4,4'-diamino-difenil-sulfona.

MATERIAL E MÉTODO

Foram utilizados ratos com 60-90 dias de idade (no início da experimentação), mantidos e alimentados segundo as normas e dieta * padrões destes laboratórios. Esses animais foram inoculados na mesma data com uma suspensão de bacilos de Stefansky; a técnica de preparação, concentração bacilar, via de inoculação e dose inoculada, são referidas em trabalho anterior¹⁶.

Os animais foram divididos em 3 lotes:

Lote A - Constituído por 38 ratos, aos quais, 8 dias após a inoculação, administrou-se a substância em estudo (4,4'-diamino-difenil-sulfona preparado e fornecido pela Secção de Química do Instituto Butantã); estes animais tiveram o seguinte destino: 3 morreram 7 dias após a administração da droga, e portanto, não computados nos resultados; 5 sacrificados no decorrer da observação e 30 observados até a morte natural (duração máxima da experiência: 18 meses).

Lote B - Constituído por 12 ratos, aos quais administrou-se o DDS após 7 meses de evolução da moléstia. Dêstes, 4 animais foram sacrificados no dia em que se iniciou o tratamento para verificação do estado evolutivo da moléstia nessa data.

Lote C - Abrange um grupo de 57 ratos contrôles; êsse número compreende os 10 ratos contrôles desta experiência e 47 outros (inoculados com a mesma suspensão, dose, via e mantidos em idênticas condições) testemunhos de experiências quimioterápicas que se processaram na mesma época. Consideraremos nos resultados os dados obtidos com o grupo de 57 animais, o que confere maior valor estatístico aos dados obtidos neste trabalho. Da mesma maneira, nos trabalhos subseqüentes êstes 57 ratos contrôles serão referidos em conjunto.

Segundo a natureza da substância em estudo, o método de administração foi o da dieta-droga.

* Dieta estoque, com a seguinte composição indicada por Moura Campos, F. (Vitaminas em alguns alimentos brasileiros. — A Folha Médica, 23:95, 1942):

Caseína comercial	20%
Amido	55%
Manteiga fresca	15%
Mistura de sais (Mendel-Osborne)	4%
Levedo de cerveja sêco	4%
Óleo de fígado de bacalhau	2%

Procurou-se fornecer aos animais 45 miligramas diários de DDS; a droga foi adicionada ao alimento * na proporção de 0,3%; aos animais ofereceu-se 15 gramas da mistura droga-dieta e controlou-se, individualmente, as quantidades ingeridas no fim de 24 horas. Conhecendo-se as sobras foi possível a determinação da dose diária de substância ingerida para cada rato (tabela 1); a dose média geral ingerida pelos animais do lote A foi de 42,66 miligramas por dia, sendo os limites máximo e mínimo, respectivamente, 43,62 e 41,98. Em um caso, excepcionalmente, a dose

TABELA 1

N.º do animal	Quantidade média diária de droga ingerida em miligramas	Total de droga ingerida em gramas
608	42,59	10,817
609	42,21	14,266
610	42,13	19,590
611	42,76	14,752
612	42,31	20,308
613	42,62	13,638
614	42,92	16,219
615	43,52	18,224
616	43,21	15,469
617	43,10	23,274
618	42,51	14,666
619	42,90	14,800
620	41,98	10,117
621	43,21	15,382
622	43,43	22,019
623	42,86	14,872
624	42,00	20,034
625	42,80	11,898
627	42,30	9,729
628	42,90	8,537
631	43,14	12,284
632	43,33	16,335
633	43,25	8,390
634	42,14	15,592
635	43,60	16,524
636	42,38	16,274
637	42,78	19,080
638	42,04	17,404
639	43,08	20,420
640	42,24	12,250
641	43,55	9,276
642	43,46	8,648
643	32,90	3,980
644	43,62	8,288
645	43,45	8,994

* A droga e o alimento devem ser finamente pulverizados e a mistura bastante homogênea para evitar-se possibilidade de escolha pelo animal.

média diária foi de 32,9 miligramas. As doses totais ingeridas por rato variaram com o tempo de sobrevivência (tabela 1) .

A administração do DDS foi contínua nos lotes A e B durante todo o período de tratamento, exceto uma interrupção de 8 dias no lote A (em virtude de manifestações tóxicas surgidas no sétimo dia de administração) e 10 dias no lote B (pelo mesmo motivo) .

Segundo a prática corrente em quimioterapia experimental empregou-se durante todo o decorrer da experiência doses muito próximas da máxima tolerada. A dose escolhida foi a que provocou alterações ligeiras na curva individual de peso dos ratos.

Durante a experiência foi feito o registro ponderal dos animais dos lotes A e C (fig. n.º 1).

Registro ponderal

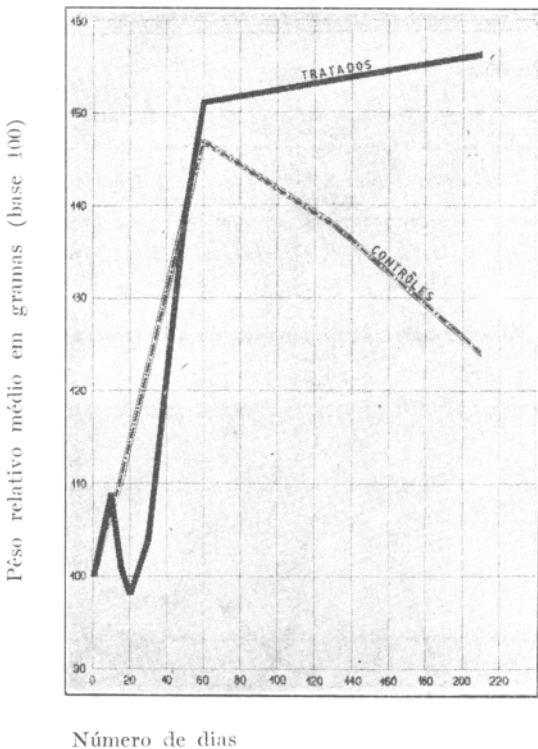


Fig. n.º 1

A anotação das datas de morte dos animais forneceu dados para constituição da curva de sobrevivência (fig. n.º 2), do agrupamento de freqüência da mortalidade (tabela 2) e respectivo gráfico (fig. n.º 3).

Curva de sobrevivência

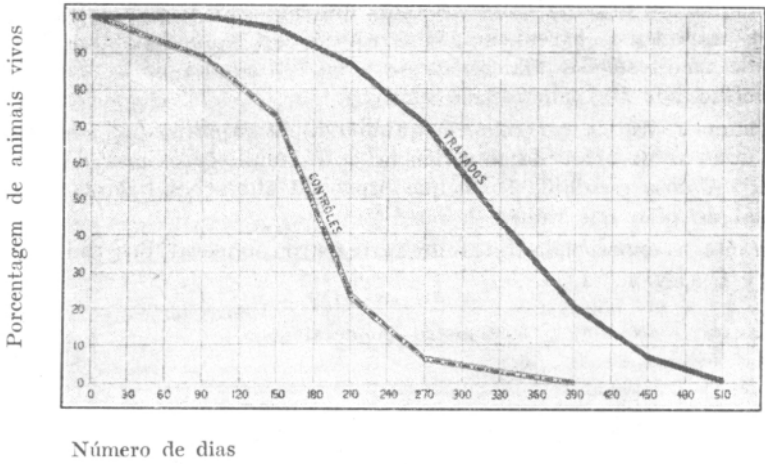


Fig. n.º 2

Mortalidade: agrupamento de freqüência

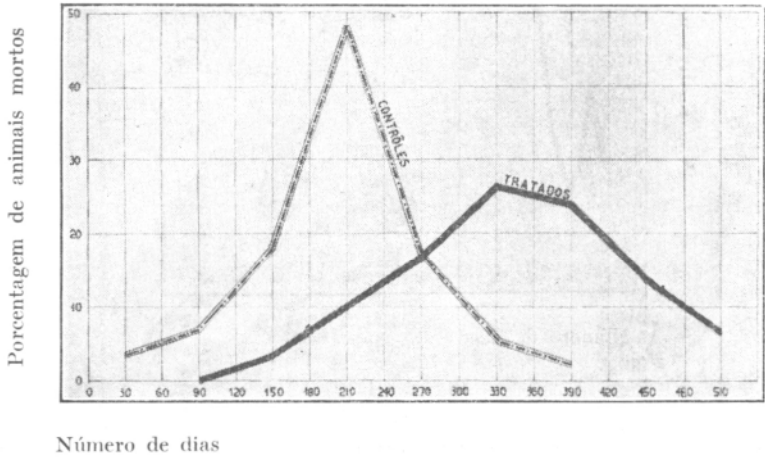


Fig. n.º 3

TABELA 2
Mortalidade: agrupamento de freqüência.

N.º de dias	Animais tratados		Animais contrôles	
	N.º absl.	N.º rel. %	N.º absl.	N.º rel. %
0- 60	—	—	2	3,51
60-120	—	—	4	7,02
120-180	1	3,33	10	17,54
180-240	3	10,00	28	49,12
240-300	5	16,67	9	15,79
300-360	8	26,67	3	5,26
360-420	7	23,33	1	1,75
420-480	4	13,33	—	—
480-540	2	6,67	—	—
Total	30	100,00	57	99,99

TABELA 3
Mortalidade: características estatísticas.

Características	Animais tratados	Animais contrôles
N.º de observações	30	57
Média (em dias)	343,80	193,20
Erro padrão da média	± 15,30	± 9,37
Erro provável da média	± 10,20	± 6,32
Moda (em dias)	345,00	209,18
Mediana (em dias)	345,00	207,85
Desvio padrão	± 85,20	± 70,80
Erro padrão do desvio padrão	± 10,80	± 6,63
Erro provável do desvio padrão	± 7,20	± 4,47
Coefficiente de variação	24,79%	36,64%
Coefficiente de assimetria	— 0,01	— 0,23
Desvio médio	71,70	51,58
Relação: desvio padrão/desvio médio .	1,18	1,35

TABELA 4
Comparação das médias dos animais tratados e contrôles.

Diferença entre as médias	150,60 dias
Erro padrão da diferença	± 18,41
Relação: diferença das médias/erro padrão da diferença	8,17

Os animais sacrificados ou mortos no decorrer da experimentação foram necropsiados; colheu-se fragmentos de órgãos (fígado, baço, gânglios linfáticos tráqueo-brônquicos, abdominais e axilares, pulmão, peritônio parietal; visceral e epíplon, medula óssea e eventualmente órgãos genitais, etc.), para estudo histológico e bacterioscópico. O material foi fixado em formol a 10%, incluído em parafina e corado pelos métodos de hematoxilina-eosina e Ziehl.

Na representação esquemática do exame macroscópico e histológico de cada rato (figuras 4 e 5), as áreas pretas ou ponteadas significam intensidade maior ou menor do comprometimento dos diferentes órgãos. A presença de raros pontos diz respeito apenas às lesões microscópicas.

Tomando como índice o máximo de intensidade das lesões nos órgãos mais atingidos pela moléstia, de acordo com a "tabela chave" (tabela 5), construiu-se um quadro no qual está representada numericamente a intensidade das lesões nos animais que receberam tratamento (tabela 6).

RESULTADOS

LOTE A (*tratamento da moléstia no período inicial de evolução*). —

Para facilitar a exposição dos resultados obtidos com o tratamento pelo DDS serão relatados paralelamente os dados do lote C (contrôles).

1 — *Registro ponderal* - A análise da figura n.º 1 demonstra que durante os primeiros 10 dias de tratamento há elevação do peso relativo médio, tanto dos animais que ingerem o DDS como dos controles; durante os 10 dias seguintes observa-se dissociação das curvas; há uma queda evidente do peso corporal dos animais em tratamento. Este fato deverá estar relacionado com a toxicidade inicial da substância em estudo. No entanto, a recuperação do peso corporal é rápida, igualando-se ao dos controles no 50.º dia. Por volta do 60.º dia há nova dissociação das curvas, agora em sentido inverso, isto é, os animais tratados continuam a ganhar peso ao contrário dos controles. A partir do 7.º mês não foi possível registrar a comparação, tendo em vista a morte da maior parte dos controles.

2 — *Sobrevivência* - A análise da curva de sobrevivência (fig. 2) revela que os animais controles começam a morrer 30 dias após a inoculação, atingindo o máximo percentual por volta do 7.º mês; nessa época 77,19% dos controles estão mortos. Os animais restantes morrem nos meses subseqüentes, sendo a sobrevida máxima no lote C (controles) 13 meses (390 dias). Deve-se notar que 6 meses após a inoculação cerca de 50% dos controles morreram.

A morte dos animais tratados se inicia após 5 meses de tratamento e atinge o percentual máximo por volta do 11.º mês; a análise da curva de sobrevivência revela que nessa época existem somente 1,75% de animais controles vivos, enquanto que permanecem com vida 43,33% dos tratados;

êstes têm sobrevivência máxima de 18 meses, limite bastante superior ao dos contrôles.

O agrupamento de freqüência da mortalidade (tabela 2) e respectivo gráfico (fig. n.º 3), também evidenciam o comportamento diferente nos dois grupos, demonstrando prolongamento da vida dos animais que receberam DDS *, em relação aos respectivos contrôles.

Calculadas as características estatísticas para a mortalidade nos dois grupos (tabela 3), nota-se que a diferença entre as médias, medianas e modas são pronunciadas, evidenciando sempre maior sobrevida do lote tratado. A diferença entre as médias nos dois grupos, o erro padrão da diferença e a relação entre essa diferença e seu erro padrão, foram calculados (tabela 4) evidenciando que os resultados possuem significação estatística. A aplicação do teste X² demonstra também a referida significância.

3 — *Resultados anátomo-patológicos* — Todos os animais contrôles mortos após o 6.º mês de inoculação apresentam lesões intensas de caráter grave (Hadler & Mauri ¹⁹), não havendo variações de intensidade em função do tempo de sobrevida.

A partir do início da experimentação até o 6.º mês, as alterações anátomo-patológicas dos animais em tratamento (lote A) são pequenas. Evidenciou-se lesões menos evoluídas que nos contrôles; o aspecto histológico não apresenta alterações estruturais nítidas.

Por volta do 6.º mês há modificações evidentes na evolução da moléstia: lesões menores e menos numerosas em comparação com os contrôles *.

Os resultados obtidos após o 6.º mês de tratamento serão analisados dividindo-se os animais em 4 grupos de acôrdo com o tempo de ingestão da droga.

6 a 9 meses de tratamento — Os animais apresentam discreta adeno-megalia e esplenomegalia. No peritônio há nódulos epiplóicos e lesões pequenas no folheto visceral, principalmente do baço. Há lesões nos bordos dos lóbos hepáticos em forma de pontos branco-amarelados. Microscopicamente há lesões pequenas, esparsas, pouco numerosas, não confluentes, com aspectos involutivos típicos da regressão histológica ¹⁹. Predomi-

* Os animais revelaram nos 10 primeiros dias de tratamento, um quadro de intolerância relativamente grave denotada pela curva ponderal, inapetência, etc., e que possivelmente, provocou a morte de 3 animais do lote; em vista dessa possibilidade os mesmos foram excluídos dos resultados, inclusive do quadro de agrupamento de freqüência da mortalidade.

* Deve ser assinalado que por volta dessa época havia morrido cêrca de 60% dos animais contrôles e 15% dos tratados. Uma vez que os resultados de tratamento não são muito evidentes nesse período, seria praticamente inútil sacrificarmos todos os animais, interrompendo-se a experimentação. Por êsse motivo decidiu-se prosseguir até a morte natural dos animais, tendo-se sacrificado apenas 4 ratos tratados.

TABELA 5

"Tabela chave" para avaliação da extensão e caráter das lesões da lepra murina em ratos inoculados experimentalmente.

Aspecto das lesões		G	F	Pe	B	Pu	M	Total
Lesões evolutivas	Muito extensas	25	25	30	10	5	5	100
	Extensas	20	20	24	8	4	4	80
	Pouco extensas	15	15	18	6	3	3	60
Lesões em regressão	Inicial	10	10	12	4	2	2	40
	Média	5	5	6	2	1	1	20
	Adiantada	1	1	1	1	0,5	0,5	5
Ausência de lesões		0	0	0	0	0	0	0

G: gânglios linfáticos

B: baço

F: fígado

Pu: pulmões

Pe: peritônio

M: medula óssea

TABELA 6

Representação numérica da intensidade das lesões da lepra murina em vários órgãos; comparação entre animais tratados pelo 4,4'-diamino-difenil-sulfona e controles.

N.º de dias de tratamento	N.º de animais observados	Valores médios						
		G	F	Pe	B	Pu	M	Total
120-180	1	15	10	15	3	0	3	46
180-240	7	7,4	5,3	8,9	1,8	0,7	1,1	25,2
240-300	5	5,0	6,0	8,6	1,4	0,5	0,8	22,3
300-360	8	3,0	3,2	4,3	0,7	0,7	0,5	12,4
360-420	7	3,0	2,8	3,4	1,0	0,3	0,3	10,8
420-480	5	1,5	1,8	2,4	0,6	0,2	0,2	6,7
480-540	2	0,5	0,0	0,7	0,0	0,0	0,0	1,2
Média dos controles	10	20,4	22,4	25,2	5,9	3,4	3,2	80,5

nam as em fase inicial ou média; mais raramente há regressão de grau avançado. As lesões contêm poucos bacilos, dos quais 30-90% apresentam alterações morfológicas. Raras são as lesões abacilares.

9 a 12 meses de tratamento — Há adenomegalia discreta inconstante. No epíplon e no folheto visceral do peritônio lesões pequenas; predominam os casos com leve periesplenite. As lesões dos bordos dos lóbulos hepáticos são pequenas e inconstantes. O exame histológico revela que as dimensões das lesões e as áreas dos órgãos atingidos são menores do que no período anterior. As lesões são pequenas, não confluentes, determinando discretas alterações na estrutura geral dos órgãos lesados. A regressão das lesões é mais evidente, predominando a de grau médio; há lesões com involução acentuada e outras completamente cicatrizadas. São mais freqüentes as lesões paucibacilares e intensas as alterações morfológicas dos bacilos. Existem algumas lesões com apenas grânulos ácido-resistentes e outras abacilares.

12 a 15 meses de tratamento — Raramente observa-se adenomegalia; mais freqüente é a esplenomegalia. O fígado tem aspecto normal na generalidade dos casos e o peritônio apresenta pequenas lesões inconstantes no folheto visceral (periesplenite) e epíplon.. As lesões são muito pequenas, de número reduzido e às vezes inexistentes em alguns órgãos. Predominam as com regressão histológica avançada, havendo algumas em fase de cicatrização ou mesmo cicatrizadas. As lesões pauci ou abacilares apresentam alterações morfológicas pronunciadas; a maioria contém apenas granulações ácido-resistentes.

15 a 18 meses de tratamento - Ausência de lesões macroscópicas em todos os órgãos; deve-se notar que o aspecto geral do animal é normal, fazendo exceção apenas esplenomegalia pouco acentuada, correlacionada, provavelmente, com a hiper-hemólise. O achado de lesões pequenas no peritônio é raro. Histologicamente há ausência ou número reduzido de lesões pequenas, presentes somente em alguns órgãos (principalmente peritônio e gânglios linfáticos), com intensas alterações histológicas de caráter involutivo; há lesões cicatrizadas. A maioria não contém bacilos ou abrigam somente raros grânulos ácido-resistentes.

Em resumo, macroscopicamente evidencia-se que os animais que ingeriram o DDS têm lesões menos intensas que os controles. Histologicamente o mesmo fato é verificado, pois que, as lesões além de serem menores e menos numerosas apresentam-se em regressão tanto mais acentuada quanto maior o tempo a que o animal foi submetido à ação da droga. O comprometimento orgânico, isto é, a intensidade da moléstia, é inversamente proporcional ao tempo de tratamento. O exame da representação esquemática de cada animal deste lote em confronto com os animais controles demonstra esse fato (fig. n.º 4).

A representação numérica da intensidade das lesões (tabela 6), confrontando os animais tratados e controles, demonstra o retardamento da

evolução da moléstia e involução das lesões nos animais submetidos à ação do DDS.

LOTE B (*tratamento da moléstia em estágio avançado da evolução*). —

Este lote compreende ratos cujo tratamento teve início 7 meses após a inoculação da carga bacilar. Dêstes animais, em número de 12, 4 foram sacrificados na data em que se iniciou o tratamento, servindo de base para a avaliação da intensidade da moléstia no lote em estudo (contrôles). Os 8 restantes foram tratados com o DDS na mesma dose e via que o lote A, isto é, em idênticas condições experimentais. Deve-se assinalar, porém, que entre o 9.º e o 15.º dias a partir do início do tratamento, morreram. 3 animais, os quais, em virtude de terem sido submetidos à ação da droga durante tão breve período, poderiam também servir como contrôles indicando o grau e extensão de lesões no lote B.

O exame anátomo-patológico praticado nos animais sacrificados antes de ser iniciada a administração do DDS e nos 3 que morreram no início da experimentação, sem exceção, evidencia lesões extensas cuja intensidade é aproximadamente idêntica em todos êles. Ora, êsse fato nos faz supor que os 5 animais que sobreviveram e aos quais foi administrado o DDS, estivessem inicialmente nas mesmas condições patológicas que os sacrificados ou os que morreram nos primeiros dias de tratamento.

Aliás, o aspecto geral de todos animais do lote antes de se iniciar a administração da droga era idêntico, isto é, todos emaciados, com pêlo eriçado, secreção conjuntival, abdômen abaulado, hepatomegalia (verificável pela palpação), etc. A única maneira de se verificar com exatidão a intensidade da moléstia nos animais que iriam receber tratamento seria a prática da laparotomia e biópsia de pelo menos um órgão mais atingido pela moléstia. Esse fato, no entanto, implicaria em grande risco cirúrgico em vista do precário estado geral dos animais.

Apenas 5 animais ingeriram DDS por tempo mais longo; um durante 93 dias e os restantes cerca de 240 dias (máximo de 248 dias). Apesar de tratar-se de um número reduzido de animais os resultados obtidos foram interessantes, merecendo ser analisados.

1 — *Sobrevivência* — Tendo sido iniciada a administração do DDS, após 7 meses de evolução da moléstia, tratamento êsse que em 4 animais se prolongou por cerca de 240 dias, verifica-se que estes ratos sobreviveram 15 meses. Este número é nitidamente superior à sobrevivência máxima dos animais contrôles (lote C), permitindo a suposição de que por ação do DDS a sobrevida tenha sido prolongada.

2 - *Resultados anátomo-patológicos* (figura 5) - O animal que morreu 3 meses após o início do tratamento evidenciou lesões menos extensas que os contrôles do lote: ligeira hipertrofia ganglionar, pequenos nódulos esparsos no peritônio e nos bordos dos lóbos hepáticos e discreta peri-esplenite. As lesões apresentam aspecto histológico de involução de

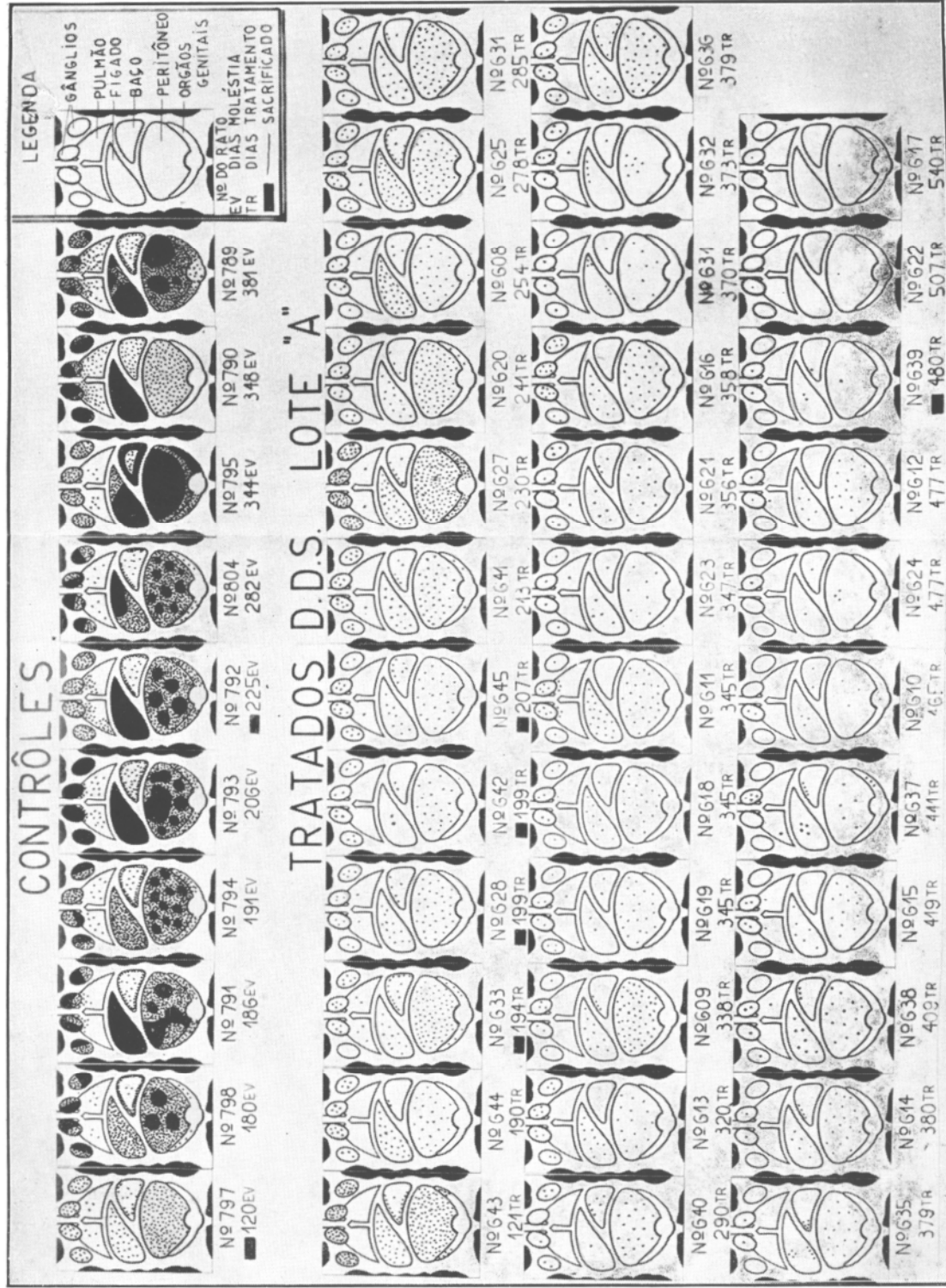


Fig. n.º 4

grau médio, pauci-bacilares. Os outros animais submetidos à ação do DDS durante 8 meses não evidenciam lesões macroscópicas. Histologicamente observa-se pequeno número de lesões, de dimensões reduzidas, em intensa regressão, habitadas por escasso número de bacilos alterados ou granulações ácido-resistentes; algumas lesões são abacilares.

Em resumo, é razoável supor que a administração do DDS aos animais do lote B tenha provocado involução de lesões pré-existentes.

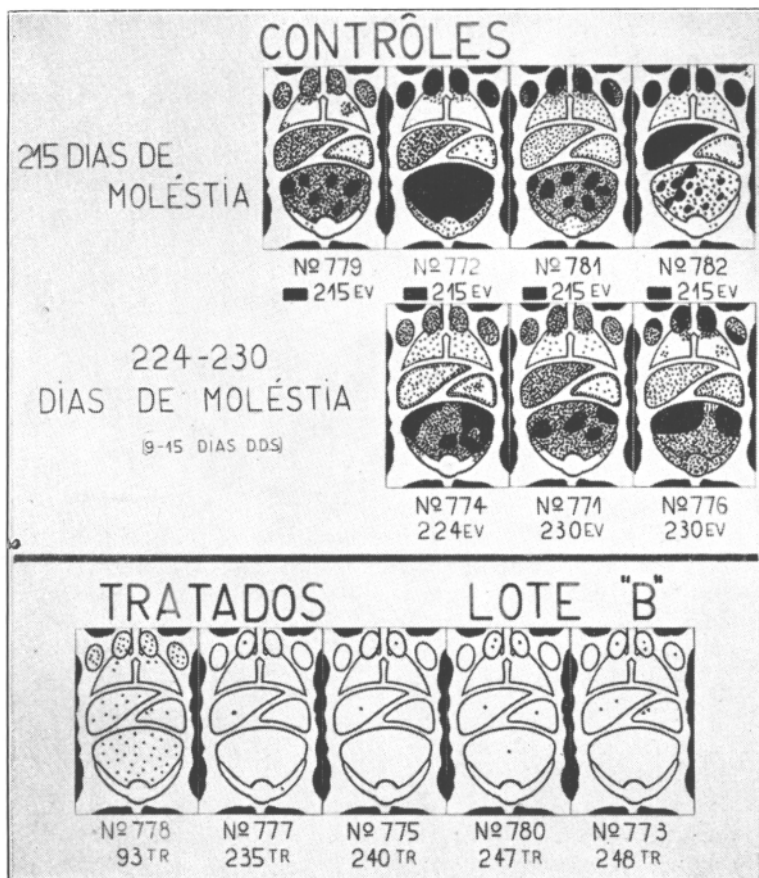


Fig.5

DISCUSSÃO

Wade ⁷³, participando das discussões patrocinadas pelo "National Research Council", nos Estados Unidos, com o propósito de planificar programas de pesquisas sobre quimioterapia da lepra, chamou a atenção para

a necessidade de avaliação terapêutica cientificamente conduzida, por métodos uniformes, estabelecendo como norma o emprêgo de testes preliminares de novas drogas que pareçam ser promissoras, porém que não tenham sido utilizadas ainda no tratamento da lepra.

Na quimioterapia da tuberculose o estudo da ação de drogas se faz tanto sobre culturas como em animais inoculados com micobactérias; nesse sentido, dentre uma série grande de compostos, diversos AA.^{10, 29,30} comprovaram a atividade quimioterápica do 4,4'-diamino-difenil-sulfona. Smith, Emmart & Westfall³¹ concluíram que a substância mãe possui maior atividade tuberculostática do que seus derivados. Segundo Northey²⁸, nenhum dos derivados possui atividade maior do que o 4,4'-diamino-difenil-sulfona.

Baseados nesses achados e, ainda mais, pela presunção de que a atividade dos derivados esteja ligada à libertação do DDS por processos catabólicos no hospedeiro, decidimos estudar a ação desse composto sobre a evolução da lepra do rato, tendo em vista que em 1948, quando iniciamos estes estudos, não tinham sido divulgados os resultados do seu emprêgo na lepra humana.

Em trabalhos anteriores, Hadler & Mauri^{17,18} preconizaram o emprêgo da lepra murina para o estudo da ação de compostos com possibilidades de aplicação na lepra humana, considerando essa experimentação como realmente científica e prática. Os resultados obtidos na lepra murina provavelmente não serão inteiramente aplicáveis à lepra humana, porém é inegável o subsídio que esses mesmos resultados poderão trazer. Mesmo que possíveis resultados terapêuticos obtidos na lepra murina não possam ser transportados para a lepra humana, ou que as substâncias empregadas no rato não se apliquem diretamente no homem, estes fatos não invalidam o método baseado no emprêgo da lepra murina. As semelhanças existentes entre os dois bacilos permite esperar que os resultados obtidos em relação a um deles, sejam pelo menos parcialmente válidos para o outro e, portanto, dignos de ser considerados. A esse respeito já referimos em trabalho anterior as opiniões de Hanks²⁰ e Fite¹¹ que acreditam ser a lepra do rato a via mais indicada para testar drogas antilepróticas. Acrescente-se ainda a opinião de Carpenter⁵, que acredita ser a lepra murina o melhor meio para a investigação dos problemas obscuros da infecção humana, principalmente na avaliação de novas drogas no tratamento da lepra. O tipo de moléstia induzida pela inoculação intra-peritonal do *Mycobacterium lepraemurium*, no rato, determina uma infecção generalizada de caráter progressivo, comprometendo sistematicamente certos órgãos de predileção¹⁶. Há desenvolvimento da moléstia em 100% dos casos e idêntico comprometimento orgânico (variações somente na intensidade das lesões do fígado e do peritônio que são inversamente proporcionais entre si). Grunberg & Schnitzer¹⁵ também empregam essa via para estudos da ação de substâncias sobre a moléstia produzida em camundongos inoculados pelo *M. lepraemurium*.

Hanks²¹ não obteve, com a inoculação intra-peritonal, uma infecção visceral e linfática de caráter progressivo; talvez esse fato esteja relacionado à amostra bacilar, dose inoculada, raça dos animais, alimentação, etc. Em nossos laboratórios sempre conseguimos obter a moléstia genera-

lizada em todos os animais; note-se que desde 1947, época na qual iniciamos os ensaios de quimioterapia ²⁵, até esta data foram inoculados mais de 1.000 ratos por essa via.

Quando se utiliza a inoculação subcutânea desenvolvem-se quadros anátomo-patológicos diversos, sendo freqüente a formação de uma única lesão no ponto de inoculação (esta opinião é corroborada por Grunberg & Schnitzer ¹⁵). Uma das eventualidades é a necrose central do nódulo subcutâneo que ulcera, supura e cicatriza espontaneamente. Nos animais inoculados pela via subcutânea, nos quais há propagação da moléstia, o comprometimento do sistema linfático e de outros órgãos é variável do que resultam graus diferentes de infecção.

Por estas razões foi preferida a via de inoculação peritonial para os nossos ensaios quimioterápicos.

O decurso natural da lepra murina nos animais contrôles é progressivo e compromete órgãos de importância vital; como conseqüência os ratos perdem peso, apresentam estado geral precário, sobrevivendo em média 193,2 dias (máximo de 390 dias).

Por outro lado, os animais submetidos ao tratamento pelo 4,4'-diaminodifenil-sulfona (lote A) evidenciam aumento de peso progressivo, estado geral relativamente bom, com sobrevida média de 343,8 e máxima de 540 dias.

Conforme foi assinalado, as doses de DDS empregadas foram elevadas, muito próximas à Dose Máxima Tolerada (D.M.T.). No início da administração os ratos (com 100 gramas de peso) ingeriam diariamente cerca de 420 miligramas por quilo (no homem adulto, em relação às doses habituais de 0,3 gramas por dia, emprega-se cerca de 5 miligramas por quilo de peso corporal). Com o aumento ponderal dos ratos (em média: 220-250 gramas no fim da experimentação), as doses passaram a ser de 168 a 210 miligramas por quilo, portanto doses também elevadas, muitas vezes superiores às utilizadas no homem.

Ora, se considerarmos que alguns animais tratados morreram apresentando moléstia de intensidade pequena, sem justificação objetiva da "causa mortis", poderíamos supor que a morte decorreu, pelo menos em grande parte, por influência de doses elevadas da droga (intoxicação crônica *); levando em conta esse fato, somos forçados a admitir que a sobrevivência média dos animais tratados foi influenciada pela ação deletéria, ou melhor, a sobrevida média teria sido maior se as doses empregadas não fossem tão elevadas. Apesar disso houve aumento nítido da sobrevivência, conforme vimos, o que reflete uma ação quimioterápica da droga.

Aos animais do lote A administrou-se a droga na época em que as lesões determinadas pela moléstia eram incipientes. O exame anátomo-patológico revela no início do tratamento que as lesões evoluem progressivamente, porém em ritmo menos intenso que nos contrôles. Isto demonstra

Esta suposição é confirmada pela presença de lesões degenerativas em diversos Órgãos dos animais submetidos à ação da droga durante períodos longos de tratamento.

que inicialmente o 4,4'-diamino-difenil-sulfona não inibe o desenvolvimento das lesões, porém retarda o ritmo evolutivo da moléstia.

Os animais examinados posteriormente revelam lesões cada vez menos intensas (tanto menos intensas quanto maior o tempo de tratamento), com características histológicas de regressão (fotomicrografias n.ºs 1 a 12); o grau de involução das lesões é proporcional ao tempo de ingestão da droga. Por volta do 18.º mês não se observam lesões macroscópicas, a regressão histológica é intensa e as alterações da morfologia bacilar são pronunciadas. Deve ser assinalado que a maioria das lesões não contém bacilos.*

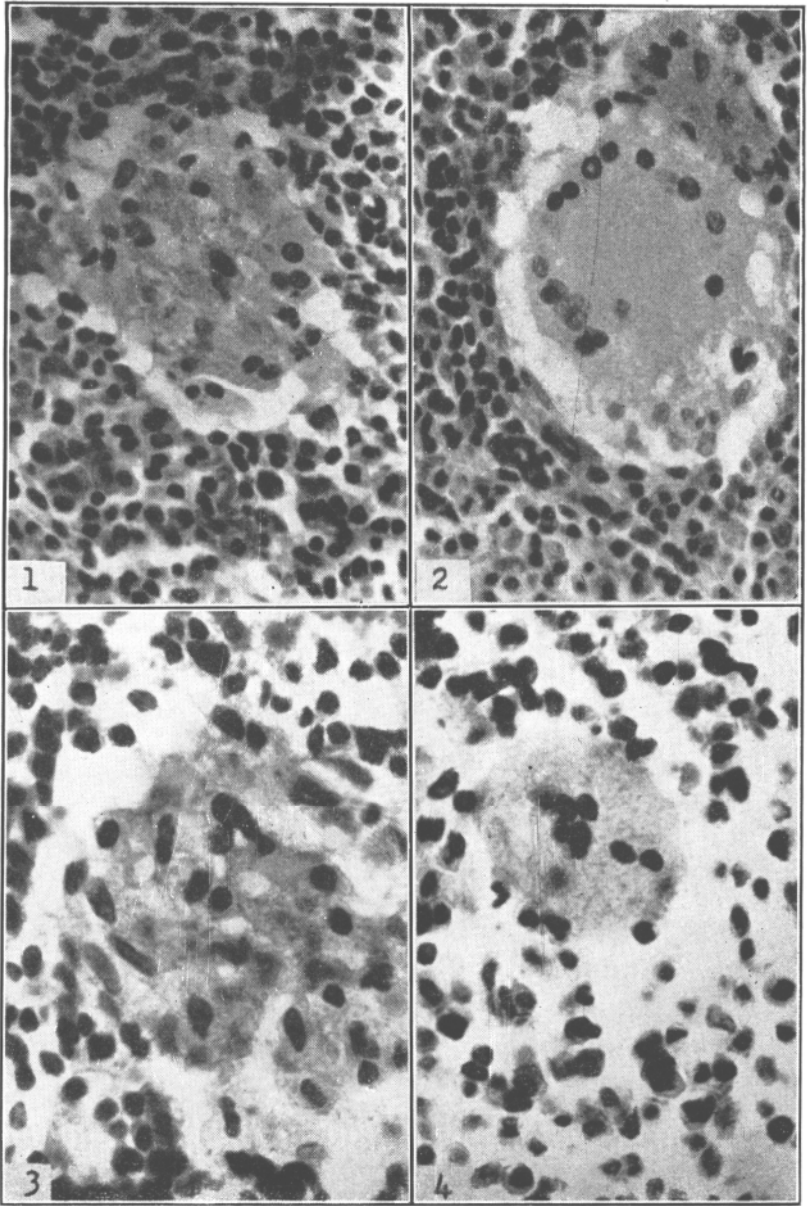
O retardamento do ritmo evolutivo da moléstia demonstrado inicialmente, associado ao número decrescente de lesões, todas com características histológicas de regressão e mais ainda, a ausência macroscópica de comprometimento visceral no 18.º mês de tratamento, permitem concluir por uma ação quimioterápica do 4,4'-diamino-difenil-sulfona; esta atividade é demonstrada após longo tempo de administração da substância. Deve ser assinalado que os controles não apresentam regressão espontânea da moléstia.

Os resultados obtidos com o tratamento instituído a animais cuja moléstia se achava plenamente desenvolvida (lote B) são passíveis de contestação, considerado o fato de não ter sido comprovado diretamente o comprometimento visceral grave no início da administração da droga. No entanto, esses animais tiveram prolongamento da vida média em relação aos animais controles e ao exame anátomo-patológico demonstraram ausência de lesões macroscópicas; o exame histológico revelou pequenos nódulos, em número escasso, involutivos e contendo poucos bacilos. Em resumo, supondo-se que os animais apresentassem comprometimento visceral grave antes da administração da droga, é razoável concluir que o 4,4'-diamino-difenil-sulfona demonstrou possuir ação quimioterápica curativa das lesões pré-existentes.

Grunberg & Schnitzer¹⁵ administraram o DDS a camundongos inoculados com o *M. lepraemurium* e após 28 dias de tratamento concluíram pela ausência de ação dessa substância. Deve ser notado que esses AA. empregaram tempo excessivamente curto para evidenciação de qualquer resultado quimioterápico na lepra murina; além disso, o camundongo não é animal ideal para esse gênero de estudos, em vista do longo tempo necessário para demonstração de ação de substâncias.

Em resumo, os resultados obtidos através da nossa experimentação demonstram atividade quimioterápica do 4,4'-diamino-difenil-sulfona na lepra murina, a qual se superpõe à obtida e divulgada pela literatura na lepra humana. No entanto, queremos salientar que não foi conseguida a cura

* Um fato que deve ser levado em conta é o tempo relativamente longo de eliminação dos bacilos mortos inoculados. A inoculação no rato do *M. lepraemurium* previamente autoclavado, produz lesões que regredem lenta e espontaneamente; 6-8 meses após à inoculação ainda há lesões em fase avançada de involução contendo bacilos com alterações morfológicas intensas.



Gânglio linfático

Aspecto de lesões em regressão histológica (ratos tratados pelo 4-4'-diaminodifenil-sulfona).

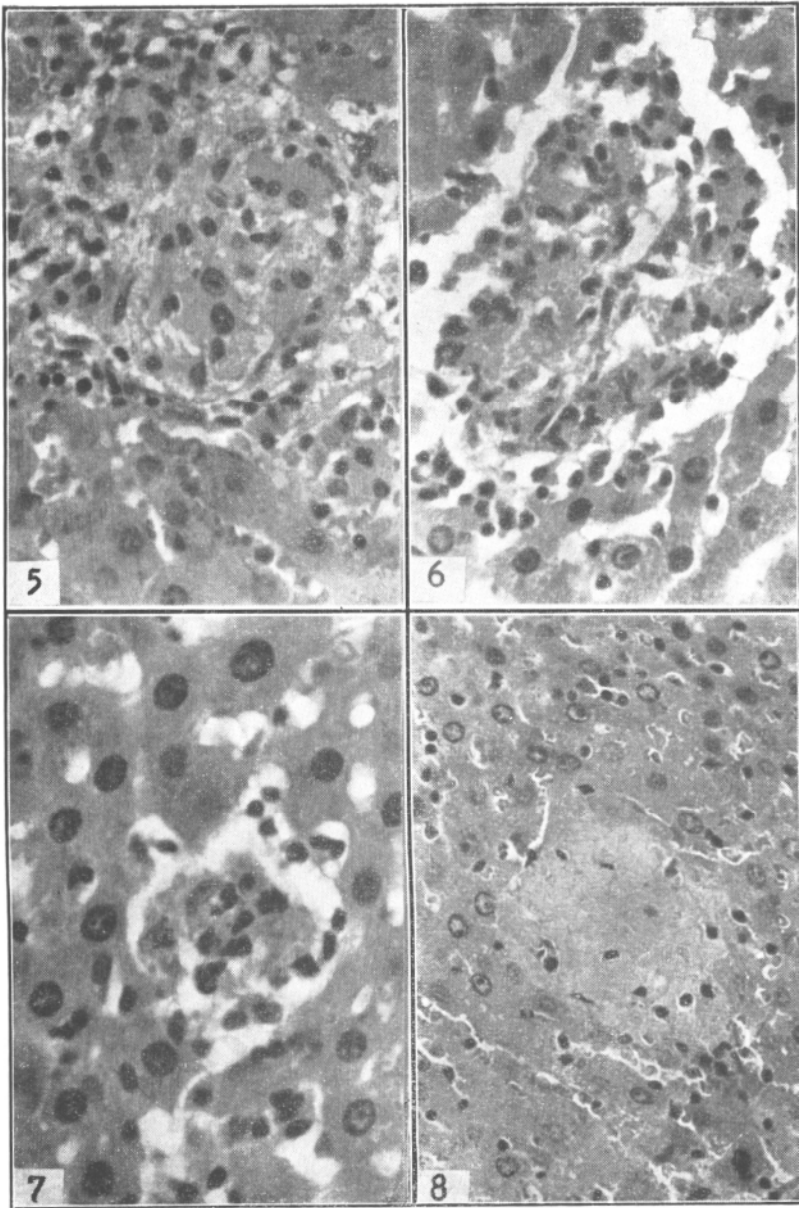
Involutive aspects of lesions in the lymph nodes of rats under 4-4'-diaminodiphenyl-sulfone therapy.

N.º 1 — H.E. — 450x { microvacuolização do citoplasma

N.º 2 — H.E. — 450x { microvacuolization of cytoplasm

N.º 3 — Ziehl-Faraco — 450x — Regressão avançada; lesão paucibacilar.
Advanced stage of involution; very few bacilli.

N.º 4 — Ziehl-Faraco — 450 x — Regressão avançada; ausência de bacilos. Advanced stage of involution; absence of bacilli.



Fígado

Aspecto das lesões em regressão histológica (ratos tratados pelo 4-4'-diamino-difenil-sulfona).

Involutive aspect of lesions in the liver of rats under 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone therapy.

(Coloração pelo método H.E.)

N.º 5 — 450x

N.º 6 — 450x

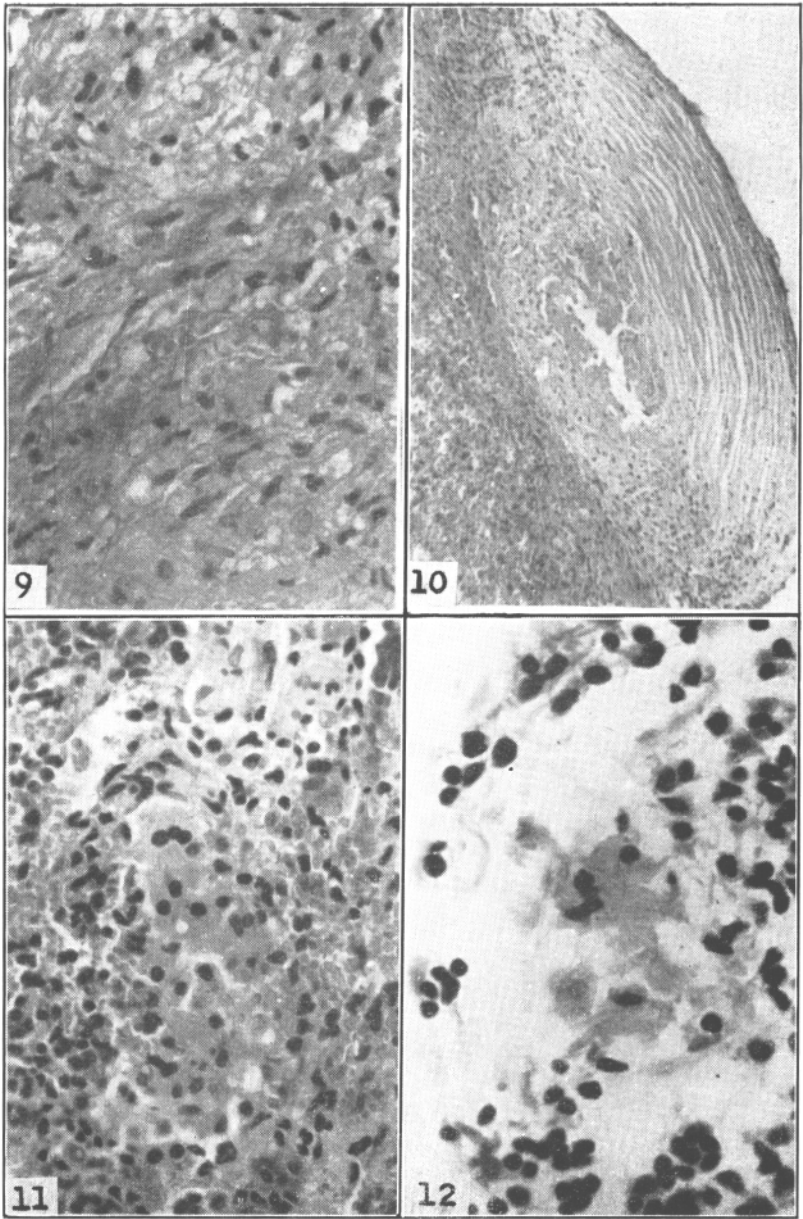
N.º 7 — 600 x

N.º 8 — 450 x

Lesões em involução média e avançada.
Lesions in the medium and advanced degree of involution.

Nódulo fibroso cicatricial.

Sequelae of nodule; complete cicatrization.



Baço

Lesões em regressão histológica (ratos tratados pelo 4-4'-diamino-difenil-sulfona).

Involutive lesions in the spleen of rats under 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone therapy.

(Coloração pelo método H.E.)

N.º 9 — 450 x — Intensa vacuolização celular.

Note the intense celular vacuolization.

N.º 10 — 100 x — Peri-esplenite leprótica em cicatrização.

Leprotic perisplenitis in cicatrization.

N.º 11 — 450 x — Lesão involutiva na polpa vermelha.

Involutive lesion in the red pulp.

Peritônio

N.º 12 — 450 x — H. E. — Nódulo do epíplon em regressão histológica intensa. Epiploon nodule in histology involution

histológica da lepra no rato, nas condições experimentais descritas, assim como não se observou ausência absoluta de bacilos alterados ou não em todas as lesões. A presença de raros bacilos morfológicamente alterados não significa, obrigatoriamente, a inviabilidade dos mesmos.

Dificuldades de ordem técnica aliadas à condições óbvias da experimentação em lepra, impediram-nos, até o presente, testar a ação bactericida ou bacteriostática, *in vitro*, dessa substância.

Não procuramos, da mesma maneira, interpretar e estudar em detalhes a interação droga-hospedeiro, assim como não damos qualquer interpretação quanto ao mecanismo de ação do 4,4'-diamino-difenil-sulfona.

Experiências da mesma natureza e que constituirão motivos de próximas publicações foram feitas com várias drogas, cuja atividade quimioterápica na lepra murina é desconhecida; as contribuições que estudos desta natureza poderão trazer são óbvias, abrindo campo para pesquisas de novos compostos de aplicabilidade na lepra.

CHEMOTHERAPY OF THE EXPERIMENTAL MURINE LEPROSY

I — Action of the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone on the development of murine leprosy.

In 1908, during studies with dyes, From & Wittmann ¹⁴ synthesized the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone. Only in 1987 Buttle ² and his assistants demonstrated the anti-bacterial activity of this substance in the streptococcal infection of mice. The same year Fourneau et al ¹³ evidenced similar action. In 1939 Rist ²⁹ demonstrated that the DDS inhibit the multiplication, *in vitro*, of the human, avian and bovine tubercle bacilli. In 1940 this same A., together with Bloch and Hammon ³⁰ studying the action of DDS on the development of tuberculous lesions of guinea pigs and rabbits, revealed the inhibitor effect of the substance on the evolution disease. In 1942, Smith, Emmarth and Westfall ³¹ observed that among a large series of compounds the DDS has the most evident anti-tuberculous action. Feldman, Hinshaw and Moses ¹⁰ in 1944 gave to guinea pigs inoculated with tubercle bacillus, 0,15 grams per day, per os, of DDS; the animals treated such way presented smaller lesions that the controls. Its effects were greater when they continued the experience in another series of animals, in which case the mortality was inferior to 30 per cent.

In 1948 appears the first reference to the use of DDS in the treatment of human leprosy, by Cochrane ⁶; in spite of the fact that it only made reference to the utilization of this substance by the parenteral route, without giving definite results, the A. evidenced considerable clinic improvements. This same A., together with Ramanujan, Paul and Russell ⁷ applied the DDS by injection, and considered it the most efficient agent used in leprosy; among us, in 1949, Belli, Rieckmann, Perego and Rzeppa ¹ synthesized the DDS. Souza Lima ³² started his experiments with this substance in June, 1948, treating 46 leprosy cases with 0,8 grams daily by mouth; after 15 months of observation he related, its great therapeutic activity. Mauri & Hadler ²⁴ (preliminary report), using the same substance in treating the experimental murine leprosy, noted its action upon the evolution of the disease and changes in the bacillar morphology, after 8 months of administering daily 0,040 grams (drug-diet method).

In another study published in 1949, Lowe & Smith ²³ treated 54 patients with DDS, using 0,30 grams (oral); in tuberculoid and lepromatous form the therapeutic results is more rapid than that obtained with its derivatives. Using the

DDS in oily suspension at 20% Mollesworth, Narayanaswami & Simpson ²⁶ published in 1949 the result of the treatment of 100 lepers, obtaining clinic improvements in 96 and bacteriological in 27. Floch & Destombes ¹² published, in 1949, the results of using DDS, arriving at the conclusion that they were not inferior from that obtained by others AA. and from them with their derivatives. In 1950 Muir ²⁷ published the results obtained with the use of DDS in 94 cases arriving at the conclusion that there were obtained considerable improvements in 48% of 50 cases treated for more than 9 months. For this A. the DDS is as efficient in the treatment of leprosy as its derivatives already known and previously used.

The 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone, or Bis (4-aminophenyl) sulfone has a great toxicity, having its N-substituted derivatives been clinically more used than the parent substance. According to Northey ²⁷ it can be supposed that the activity of these N-substituted derivatives is connected to the release of DDS by catabolic process; the proof of this fact is demonstrated by the reduced activity of these compounds, *in vitro*, in the finding of the amino-group diazotizable in the blood when these substances were taken, and in view of the fact that none of these N-substituted derivatives showed greater activity than the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone.

The analysis of the therapeutic activity of a drug can be made only studying in animals its ability to arrest the evolution of induced diseases which existed before the treatment was started (Karlson and Feldman ²²). In view of being impossible till now to find animals susceptible to the *M. leprae*, where it could have been found lesions of a progressive character, Haller & Mauri¹⁷ proposed the use of the murine leprosy as an experimental control test of compounds with possible chemotherapeutic activity. These AA. showed clearly that the results obtained with the use of substances in the murine leprosy cannot be entirely compared to those obtained in the human leprosy but can eventually be correlated. The type of induced disease in the rat inoculated with the *M. lepraemurium*, offers very good conditions to test the efficiency of the chemotherapeutic agents against intracellular bacilli of progressive leprosy nodules.

We obtained some references with regard to the treatment of the murine leprosy with derivatives of the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone ^{3,4,8} ; but we do not know any bibliographic indication regarding the use of DDS in such a disease, except the previous note of Mauri & Hadler ²⁴ published in 1949.

Material and method — There were utilized rats 60-90 days old (at the beginning of the experiment), kept and fed according to the padronized rules and diets of these laboratories. These animals were inoculated the same date with a suspension of the Stefansky's bacilli; the method of preparation, bacillar concentration, route of inoculation and portion inoculated are referred to in previous work ¹⁶.

The animals were divided in 3 groups:

LOT A: formed by 38 rats, to which was given, 8 days after the inoculation, the substance under study (4-4'-diamino-diphenyl-sulf one prepared and furnished by the Chemistry Division of the Butantã Institute) ; 3 animals died 7 days after taking the substance and therefore were not computed in the results; 5 were sacrificed during the period of observation and 30 were under study till their natural death (maximum period of the experiment 18 months).

LOT B: formed by rats, to which was given the DDS after 7 months of the disease. Of these, 4 animals were sacrificed the day the treatment was started, in order to verify the evolution of the disease at that date.

LOT C: formed by a group of 57 control rats; this number includes the 16 control rats of this experiment and another 47 (inoculated with the same suspension, route, and kept in identical conditions) used in other chemotherapeutic experiments at the same time. We will consider in the results the data obtained from the group of 57 animals, what gives a greater statistic value to the data contained in this report. Therefore, in the subsequent reports these 57 rats controls will be referred together.

According to the nature of the substance under study, the easiest method was that of the drug-diet.

It was tried to give to the animals 45 miligrams daily of DDS; the drug was added to the food* in the proportion of 0,3%; the animals received 15 grams of the drug-diet mixture and the portions taken after 24 hours were controlled individually. Knowing the left-overs it was possible to determine the daily portion of the substance given to each rat (table 1); the average portion taken by the animals of Lot A was 42,66 miligrams per day, the maximum and minimum limits being respectively 43,62 and 41,98. In only one case the daily portion was of 32,9 miligrams. The total portions taken by each rat varied according to the survival period (table 1).

The DDS was given continually to rats of lots A and B during all the period of the treatment, except when there was an interruption of 8 days in lot A (due to toxic effects noted on the 7th. day) and 10 days in lot B (for the same reason).

According to the current practice in experimental chemotherapy, there were used doses too close to the maximal tolerated dose during the course of the experiment.

The dose chosen was that which produced little alterations in the individual curve of the rats' weight. During the experiment the ponderal register of the animals was made in lots A and C (figure n.º 1).

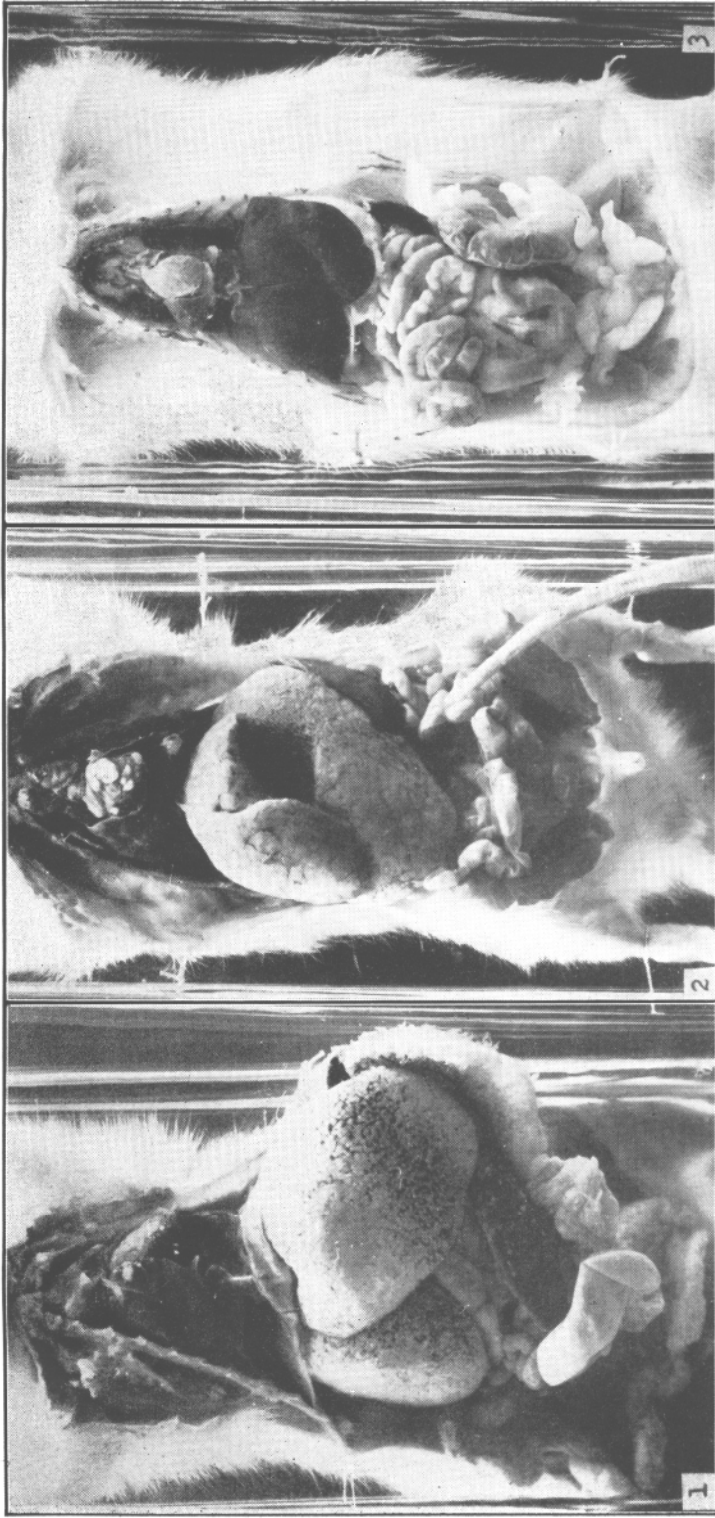
The date the animal died furnished details for the constitution of the curve of survival time (figure n.º 2), for the grouping of frequency of mortality (table 2) and the respective graphic (figure n.º 3).

The animals sacrificed or dead during the course of the experiment were necropsied; there were picked up fragments of organs (liver, spleen, tracheo-bronchic, abdominal and axilar lymph nodes, lungs, parietal peritoneum, visceral and epiplon and eventually genital organs, etc.) for histologic and bacterioscopic examination. The material was fixed in formol at 10% included in paraffin and dyed according to the hematoxilín-eosine and Ziehl modified methods.

In the schematic representation of the macroscopic and histologic findings of each rat (figures 4 and 5), the black and dotted areas represent the greater or minor intensity reflected in the different organs. The few points indicate only the microscopic lesions.

Taking as a basis the greater intensity of the lesions in the organs more affected by the disease, in accordance with the key-table (table 5), was designed another table, which represents numerically the intensity of the lesions in those animals which received treatment (table 6).

* The substance and the food must be very finely pulverized and the mixture must be homogeneous, in order to avoid the possibility of choice by the animal.



1. Rato n.º 791 (contrôle): grau e extensão das lesões 186 dias após a inoculação.
 2. Rato n.º 790 (contrôle): grau e extensão das lesões 348 dias após a inoculação. Notar o comprometimento visceral grave e em particular, grande hipertrofia dos gânglios mediastinais, fígado e baço. Na foto 1, são bem evidentes as lesões peritoneais.
 3. Rato n.º 617: ausência de lesões macroscópicas 540 dias após o início de tratamento pelo 4,4-diamino-difenil-sulfona (dose média diária 43,10 miligramas; dose total 23,274 gramas). Comparar com as fotografias 1 e 2.
1. Rat n.º 791 (control) 186 days after inoculation.
 2. Rat n.º 790 (control) 348 days after inoculation. Note in the rats heavy involvement of organs and hypertrophic mediastinal lymph nodes, liver and spleen. The animals were inoculated by the peritoneal via.
 3. Rat n.º 617: DDS treatment (540 days); daily dose 43,10 milligrams and total dose 23,274 grams. The organs did not show macroscopic lesions. Compare with the figures 1 and 2.

Results — Lot A (treatment of the disease in the initial period) — To facilitate the explanation of the results obtained with the DDS, we will report at the same time the data of lot C (controls).

1 — Ponderal register: The analysis of figure 1 shows that during the first 10 days of the treatment there is an increase in weight, both in those animals which take DDS and those of the controls; during the 10 following days there is a disassociation in the curves; there is a decrease of the corporal weight of the animals under treatment. This fact must be connected with the initial toxicity of the substance being studied. However, the regaining of the corporal weight is rapid, levelling the controls in the 50th. day. Around the 60th. day there is another disassociation in the curves, now in the opposite side, that is, the animals treated continue to gain weight, just the contrary of the controls. After the 7th. month it was impossible to register a comparison, considering that most of the controls died.

2 — Survival: The analysis of the curve of survivance (figure 2) shows that the control animals start dying 30 days after the inoculation, reaching the maximum percentage around the 7th. month. In this period 77,19% of the controls are dead. The other animals died in the subsequent months, being the maximum survival period of 13 months (390 days) in lot C (controls). It must be noted that 6 months after the inoculation around 50% of the controls died.

The dead of the animals being treated starts 5 months after the treatment and reaches its pick around the 11th. month; the analysis of the curve of survival shows that at that time there were only 1,75% of controls alive, while 43,33% of the animals treated remain alive, these having a maximum survival period of 18 months, limit too far superior to that of the controls.

The grouping of frequency of mortality (table 2) and the respective graphic (figure 3), also evidence different effect in these two groups, showing a lengthening of survival in those animals which received the DDS*, in comparison with the respective controls.

Once it is calculated in these 2 groups (table 3) the statistic characteristic for the mortality, it is noted that the difference is remarkable, showing a larger survival period of the lot of animals treated. The difference between the average in these two groups, the standard error of the difference and the relation between this difference and its standard error were calculated (table 4), demonstrating significant statistic results.

3 — Anatomic-pathologic results: All the controls dead after the 6th. month of inoculation presented very serious lesions (Hadler & Mauri ¹⁶) there being no signs of variation in intensity, according to the survival period.

From the beginning of the experiment till the 6th. month, the pathologic alterations in animals being treated (lot A) are small. There were found less progressive lesions than in the controls; the histologic aspect of the lesions does not present nitid structural modifications.

* The animals revealed in the first 10 days of treatment a picture of intolerance relatively serious, as shown in the ponderal curve, inappetency, etc., which probably caused the death of 3 animals of the lot; in view of this possibility they were excluded from the results, as well as from the table of frequency of mortality.

Around the 6th. month there is a modification in the progressive rhythm of the disease; smaller lesions and fewer, in comparison with the controls.*

The results obtained after the 6th. month of treatment will be analysed dividing the animals in 4 groups, according to the time of treatment.

6 to 9 months of treatment: The animals present a moderate adenomegaly and esplenomegaly, epiploic nodules and small lesions in the visceral peritonium, chiefly in the spleen. There are lesions at the edges of the hepatic lobes, forming white-yellowish dots. Microscopically there are small lesions, with typical involutive aspects of the histologic involution¹⁹, prevailing those in the initial and middle phase; less frequently there is a regression in advanced phase. The lesions contain a few bacilli, of which 30-90% present morphologic alterations.

9 to 12 months of treatment: There is a moderate adenomegaly. There are small lesions in the epiploon and in the visceral region of the peritoneum, prevailing the cases of a light peri-esplenite. The lesions at the edges of the hepatic lobes are small, not confluent, determining moderate alterations in the general structure of the affected organs. The involution of the lesions is more evident; there are lesions with regressive aspect and others completely scarred. The pauci-bacillar lesions are more frequent; the morphologic alterations of the bacilli are great. There are some lesions with only acid fast granules and others are abacillar.

12 to 15 month of treatment: On rare occasions there is adenomegaly; the esplenomegaly is more frequent. The liver generally presents a normal aspect and the peritoneum presents small lesions in the visceral region (peri-esplenite) and epiploon. The lesions are very small, and sometimes absent in some organs, predominating those with a histologic involutive aspect, there being some in the phase of cicatrization and others even scarred. The bacillar lesions present important morphologic alterations and most of them contain only acid fast granules.

15 to 18 month of treatment: Absence of macroscopic lesions in all organs; sometimes signs of esplenomegaly, correlated probably with the hiperhemolis. The small lesions in the peritoneum are rare. Histologically there is absence or a reduced number of small lesions, these being present only in some organs (principally in the peritoneum and lymph nodes) showing histological involution; there are scarred lesions. Most of them do not contain bacilli or sometimes few acid fast granules.

Summarizing, macroscopically it is evident that the animals which received the DDS have less intense lesions than the controls. Histologically the same fact is observed due to the fact that the lesions, besides being smaller and fewer, present a regression so much nitid as longer is the period the animal was submitted to the action of the drug. This fact is demonstrated (figure n.º 4) by the schematic representation of each animals of this lot in comparison with the control animals. The numeric intensity of the lesions (table 6) in comparison with the controls and animals treated shows the delay in the evolution of the disease and the regressive character of the lesions in animals submitted to the action of DDS.

LOT B (treatment of the disease in the progressive stage) — This lot is composed of rats which treatment was initiated 7 months after the inoculation of the bacilli. From these animals, in number of 12, 4 were sacrificed the day the

* It must be noted that about that time 50% of the control animals and 15% of those treated died. Once the results of the treatment are not too evident at that period, it would be useless to sacrifice all the animals, interrupting the experiment. For this reason it was decided to continue till the natural death of the animals, having been sacrificed only 4 treated rats.

treatment was initiated, serving as a basis for estimating the degree of the disease of the lot being studied (controls). The other 8 were treated with DDS in identical experimental conditions as lot A. It must be noted, however, that 3 animals died between the 9th. and 15th. day the treatment was initiated, and which could be used as controls, indicating the degree and extension of lesions in lot B.

The anatomic-pathologic finding in animals sacrificed before taking the DDS and in the 8 animals died at the beginning of the experiment, showed that these 7 rats presented extensive lesions, which are practically identical in all of them. In view of this fact it must be assumed that the 5 animals alive and to which the DDS was given, presented initially the same pathologic condition than the sacrificed or those which died after the first days of treatment.

Otherwise, before the substance was given, the general aspect of all the animals was identical, i.e., all with bristled hair, conjunctival secretion, hepatomegaly, etc. The only practicable way to verify with accuracy the degree of the disease in animals which were going to receive treatment would be the laparotomy and biopsy of at least the organ more affected by the disease. This fact, however, would imply in a great surgical risk, due to the bad conditions of the animals.

Only 5 animals received the DDS during a longer period of time; one during 93 days and the others about 240 days (maximum of 248 days). In spite of the reduced number of animals, the results obtained were interesting and must be analysed.

a — Survival: — Considering that the DDS was given after 7 months of disease's evolution, and the treatment was given to 4 animals during 240 days, these rats survived 15 months. This number is far superior to the maximum survival period of control animals (Lot C), permitting to suppose that the action of the DDS extends the survival.

b — Anatomic-pathologic results (figure 5): — The animal which died 3 months after the treatment showed smaller lesions than in the controls of the lot: a light ganglionic hypertrophy, some small nodules in the peritoneum and at the edges of the hepatic lobes and a moderate peri-splenitis. The other animals submitted to the action of DDS during 8 months did not present macroscopic lesions. Histologically there was noted a few number of lesions, of reduced size, in involution, containing a few number of altered bacilli and acid fast granules.

Discussion — Taking part in the discussions patronized by the National Research Council, in the U.S.A., Wade ³³, with the purpose of outlining programs of research about the chemotherapy of leprosy, called the attention for the necessity of a therapeutic appraisal scientifically conducted by uniform methods, establishing as a rule the use of preliminary tests of new substances which are supposed to be successful, but which have not as yet been utilized in the treatment of leprosy.

In the chemotherapy of the tuberculosis, the study of the action of substances can be made in cultures as well as in animals inoculated with different strains of mycobacterium; in this respect, among a series of compounds, various AA.^{10, 29, 30, 31} proved the chemotherapeutic activity of the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone.

Based on these facts, and moreover, supposing that the activity of the derivatives is connected to the release of DDS by catabolic process, we decided to study the action of this compound on the development of the murine leprosy, taking into

consideration that in 1948, when we started these studies, the results of its use in the human leprosy had not been published.

In previous works, Hadler & Mauri ^{17,18} preconized the use of the murine leprosy for studying the action of compounds with the possibility of its application in the human leprosy, considering this experiment really scientific and practic. The results obtained in the murine leprosy probably will not be entirely applicable to the human leprosy; however, it is undeniable the help these results can bring. Even if possible therapeutic results obtained in the murine leprosy cannot be transplanted to the human leprosy, or the drugs used in the rat cannot be directly correlated to the human leprosy, these facts do not annul the method based on the use of the murine leprosy. The resemblance between the two bacilli permits to hope that the results obtained with regard to one of them be at least partially useful for the other, and therefore worth of being considered. In this respect we have referred to, in previous work, the opinion of Hanks ²⁰ and Fite ¹¹ who believe the marine leprosy is the most indicated way to test antileprotic drugs. We have to add to this the opinion of Carpenter ⁵ who believes the murine leprosy is the best way to investigate the obscure problems of the human infection, principally for testing new substances for the treatment of leprosy.

The type of disease induced by the peritoneal route of inoculation of the *Mycobacterium lepraemurium* in the rat, causes a general infection of progressive character, damaging systematically certain organs ¹⁶. There is a development of the disease in 100% of the cases and identical extent and distribution of lesions (variations only in the intensity of lesions in the liver and peritoneum, which are inversely proportional). Grunberg & Schnitzer ¹⁵ also used this route of inoculation in chemotherapeutic studies.

Hanks ²¹ did not obtain a visceral and lymphatic infection of progressive character with the intraperitoneal inoculations may be this fact is connected with the bacillar sample, dose, animal strain, food, etc. In our laboratories we always could get the generalized disease in all the animals; it must be noted that since 1947, when we started the chemotherapeutic trials ²⁵, till now were inoculated more than 1.000 rats by this route.

When the sub-cutaneous inoculation is used, there is a development of various anatomo-pathologic forms, being frequent the formation of only one lesion, where the suspension was applied (this opinion is corroborated by Grunberg & Schnitzer ¹⁵). One of the possibilities is the central necrosis of the sub-cutaneous nodule, which ulcerates, suppurates and cicatrizes by itself. In animals inoculated by the sub-cutaneous way, where there is development of the disease, the damaged produced in the lymphatic system and other organs is variable, therefore resulting different degrees of infection.

For this reason it was given preference to the intraperitoneal inoculation for our chemotherapeutic trials.

The natural course of the murine leprosy in control animals is progressive and affects organs of vital importance; consequently, the rats start losing weight, present a bad general aspect, surviving at an average of 193,2 days (maximum of 390 days).

On the other side the animals submitted to the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone treatment (Lot A) show a progressive increase weight, general appearance relatively good, with an average survival of 343,8 and maximum of 540 days.

As it was shown, the doses of DDS used were high, nearing the Maximal Tolerated Dose. At the beginning the rats (weighing 100 grams) received daily around 420 miligrams per kilo (in the adult human being, in comparison with the habitual portion of 0,3 grams per day, it is used around 5 miligrams per kilo).

With the ponderal increase of rats (an average of 200-250 grams at the end of the experiment) the portions passed to be of 168 and 210 miligrams per kilo, therefore, high portions too, too far superior to those given to the human being.

Now, considering that some animals treated died presenting a disease of small intensity, without justifying the "causa mortis", it could be supposed that the death was caused, at least in a great part, by the high portions of the substance; taking into consideration this fact, we are forced to admit that the average survival of the animals treated was influenced by a deleterious action; or better, the average survival could be increased if the doses used were not so high. In spite of this there was a nitid increase of survival, as we have seen, which reflects the chemotherapeutic action of the substance.

The pathological findings in animals of the Lot A shows that at the beginning of the treatment the lesions develop progressively, but at a rythm less intense than in the controls. This demonstrates that the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone does not inhibit the development of the lesions, but delays the progressive rythm of the disease.

The animals examined later revealed at each time less intense lesions (as much intense as longer the period of treatment), with histological characteristics of involution (photomicrographies ns. 1 to 12); the decrease of the lesions is proportional to the time of drug's intake. Around the 18th. month there are not found macroscopic lesions, the histological decrease is great and the morphologic bacillar alterations are important. It must be noted that most of the lesions do not contain bacilli. (*)

The delay of the evolutive rythm of the disease, associated to the decreasing number of lesions, all with histological characteristics of involution and moreover, the macroscopic absence of the visceral damaged on the 18th. month of treatment, permit to conclude there is a chemotherapeutic action of the 4-4'-diamino-diphenylsulfone; this activity is demonstrated after a long period of drug intake. It must be noted that the controls do not present an expontaneous regression of the disease.

The results obtained with the treatment given to animals in which the disease was at its peak (Lot B) can be contested, considering the fact that it was not directly proved the organs was affected at the beginning of receiving the drug. However, these animals had a greater period of living in comparison with the control animals and the pathological findings showed an absence of macroscopic lesions and the histological exam revealed small nodules, very rare, involutives and containing a few bacilli. Summarizing, supposing that the animals presented a serious organs involvement before taking the drug, it is reasonable to conclude that the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone has a curative chemotherapeutic action on the pre-existing lesions.

Grunberg & Schnitzer ¹⁵ gave the DDS to mice inoculated with the *M. leprae* and after 28 days of treatment they concluded that the drug was inefective; it must be noted that these AA used an excessively short time for evidencing any chemotherapeutic results in the murine leprosy; besides that, the mice is not the ideal animal for this kind of experiment, in view of the long period of time required to demonstrate the action of drugs in this disease.

(*) One fact that must be taken into consideration is the relatively long time of elimination of the inoculated bacilli dead. The inoculation of the *M. lepramurium* in rats previously autoclaved produces lesions which decrease slowly and expontaneously; 6-8 months after the inoculation there are still lesions in advanced stage of involution containing bacilli with morphological alterations.

Summarizing, the results obtained through our experiments show a chemotherapeutic activity of the 4-4'-diamino-diphenyl-sulfone in the murine leprosy, which is added to that obtained and published in the human leprosy literature. However, we want to point out that it was not obtained the histological cure of the murine leprosy, in the experimental conditions described above, as well as there was no absence at all of the altered or unaltered bacilli in all the lesions. The presence of a few bacilli morphologically altered do not signify obligatorily they are incapable of living.

Difficulties of technic character, together with the obvious conditions of the experiments in leprosy have hindered us to test the bactericide or bacteriostatic action, *in vitro*, of this substance.

Experiments of the same nature and which will be published later, were processed with a great number of substances, which chemotherapeutic activity in the murine leprosy is unknown: the contributions that studies of this nature can bring are obvious, opening up the possibility of research of new compounds applicable to leprosy.

LITERATURA CONSULTADA

1. Berti, F. A., Rieckmann, B. H. G., Perego, C. & Rzeppa, H. W. - *Mem. Instituto Butantã* **21**:107, 1949.
2. Bottle, G. A. H., Stephenson, D., Smith, S., Dewing, T. & Foster, G. E. - *Lancet* **1**:1331, 1937.
3. Carpenter, C. M., Stockinger, H. E., Suhrland, L. G. & Ackerman, H. - *Memoria del V Congreso Internacional de la Lepra. Ed. Cenit, La Habana (Cuba)*, 1322 pg., 1949.
4. Carpenter, C. M., Stockinger, H. E., Suhrland, L. G. & Ackerman, H. - *Am. Rev. Tuberc.* **60**:359, 1949.
5. Carpenter, C. M. - *Ann. New York Acad. Sci.* **54**:101, 1951.
6. Cochrane, R. G. - *Int. J. Leprosy* **16**:139, 1918.
7. Cochrane, R. G., Ramanujan, K., Paul, H. & Russell, D. - *Leprosy Rev.* **20**:4, 1949.
8. Cowdry, E. V. & Ruangsiri, C. - *Arch. Path.* **32**:632, 1941.
9. Feldman, W. H., Hinshaw, H. C. & Moses, H. E. - *Proc. Staff Meet. Mayo Clin.* **16**:187, 1941.
10. Feldman, W. H., Hinshaw, H. C. & Moses, H. E. - *Am. J. Med. Sci.* **207**:290, 1944.
11. Fite, G. L. - *Comunicação pessoal.*
12. Floch, H. & Destombes, P. - *Int. J. Leprosy* **17**:367, 1949.
13. Fournau, E., Nitti, F., Trefouel, J., Bovet, D. & Trefouel, J. (Mme.) - *Compt. rend. Acad. Sci.* **204**:1763, 1937.
14. From, E. & Wittmann, J. - *Ber. d. deutsch. chem. Gesellsch.* **41**:2264, 1908.
15. Grunberg, E. & Schnitzer, R. J. - *Ann. New York Acad. Sci.* **54**:107, 1951.
16. Hadler, W. A. & Mauri, A. C. - *Rev. Brasil. Leprol.* **16**:189, 1948.
17. Hadler, W. A. & Mauri, A. C. - *Rev. Brasil. Leprol.* **16**:191, 1948.
18. Hadler, W. A. & Mauri, A. C. - *Int. J. Leprosy* **18**:67, 1950.
19. Hadler, W. A. - *Rev. Brasil. Leprol.* **19**:75, 1951.
20. Hanks, J. H. - *Comunicação pessoal.*
21. Hanks, J. H. - *Int. J. Leprosy* **18**:185, 1950.

22. Karlson, A. G. & Feldman, W. H. — *Ann. New York Acad. Sci.* **52**:637, 1949.
23. Lowe, J. & Smith, M. — *Int. J. Leprosy* **17**:181, 1949.
24. Mauri, A. C. & Hadler, W. A. — *Rev. Brasil. Leprol.* **17**:140, 1949.
25. Mauri, A. C. & Hadler, IV. A. — *Memories del V Congreso Internacional de la Lepra. Ed. Cenit, La Habana (Cuba)*, 1322 pg., 1949.
26. Mollesworth, B. D., Narayanaswami, P. S. & Simpson, T. A. — *Int. J. Leprosy* **17**:197, 1949.
27. Muir, E. — *Int. J. Leprosy* **18**:299, 1950.
28. Northey, E. H. — *The Sulfonamides and Allied Compounds*. Reinhold Publishing Co., New York, 660 pg., 1948.
29. Rist, N. — *Compt. rend. Soc. Biol.* **130**:972, 1939.
30. Rist, N., Bloch, F. & Hammon, V. — *Ann. Inst. Pasteur* **64**:203, 1940.
31. Smith, M. I., Emmart, E. W. & Westfall, B. B. — *J. Pharm. and Exper. Ther.* **74**:163, 1942.
32. Souza Lima, L. — *Rev. Brasil. Leprol.* **17**:143, 1949.
33. Wade, H. W. — *Int. J. Leprosy* **16**:82, 1948.