

uma tuberculina, d'origem allemã, bastante antiga; como havia necessidade de definir previamente a sua toxidez, injectámos 2 c. c. na cavidade peritoneal d'uma cobaya pequena, pesando pouco mais de 200 grammas. Não se manifestaram symptomas d'intoxicação, resultado que previamos pela diminuta toxidez da primitiva tuberculina de KOCH, desde ha muito conhecida, para os animaes não tuberculosos. Diligenciámos preparar uma tuberculina mais toxica, para o que reunimos a 100 c. c. d'uma cultura em caldo, de vegetação exhuberante, a massa bacillar d'outras culturas; pelo processo ordinario de preparação, obtivemos 10 c. c. de tuberculina. N'um coelho de 1.100 grammas de peso, praticámos uma injeccão intravenosa de 4 c. c. do liquido, sem observar signaes d'intoxicação; passados dois dias, injectámos no mesmo coelho o resto da tuberculina (6 c. c.), ainda sem effeitos toxicos. A nova tuberculina de KOCH (TR) que mais convinha pela sua toxidez elevada, não era conhecida ao tempo d'estas experiencias; para não injectar maiores porções de glicerina, vimonos obrigados a abandonar as nossas tentativas, não sem nos lembrarmos de que a tuberculina, pertencendo ao grupo chimico das nucleinas, talvez como estas possa isolar-se, em estado de maior pureza, precipitando os albuminoides das culturas e submettendo-os depois á digestão artificial.

Reacção agglutinante.—A reacção agglutinante, descoberta por BORDET (1895) nos humores d'animas immunisados contra o vibrião de KOCH, descripta e definida rigorosamente por DURHAM e GRUBER (1896) para o coli-bacillo, o bacillo typhico e o vibrião de KOCH, foi depois observada por WIDAL (1896) no sôro do homem em poder da infecção typhica e por elle introduzida na clinica como um processo rapido, simples e seguro de diagnostico da dothienenteria.

Misturando algumas gottas d'uma cultura em caldo do bacillo d'EBERTH, d'ESCHERICH ou do vibrião de KOCH com uma gotta de sôro d'um animal immunisado respectivamente contra cada um d'aquelles microbios e examinando o liquido ao microscopio, vemos que os bacillos, a principio isolados, livres e moveis, perdem pouco a pouco os seus movimentos e agglomeram-se, formando grupos ou massas distinctas; no decurso da febre typhoide (geralmente depois do primeiro septenario), durante a convalescença e ainda depois da cura completa, o sôro do homem pôde produzir uma agglutinação semelhante, mas quasi sempre menos intensa, do bacillo d'EBERTH.

Para observar a reacção agglutinante sem o auxilio do microscopio, basta addicionar uma quantidade maior de sôro (0,5 a 1 c. c., por ex.) a 10 ou 15 partes de cultura em caldo; os bacillos, então, reúnem-se em floccos mais ou menos

tenues que por tempo precipitam total ou parcialmente no fundo do vaso.

O sôro d'animaes immunisados contra outras infecções possui também propriedades agglutinantes; o d'animaes *novos*, pôde provocar uma ligeira agglutinação bacillar quando empregado em maior quantidade.

A porção de sôro e o tempo necessários para determinar a agglutinação ou, d'uma maneira mais geral, a intensidade da reacção agglutinante é, nos animaes, proporcional ao poder immunisante dos sôros (GRUBER) mas, no homem, não parece depender directamente do grau de resistencia ao bacillo d'EBERTH; notemos, entretanto, que ella manifesta-se nitida e constantemente depois da vacinação pelo processo de WRIGHT e SEMPLE. A variedade do bacillo influe também na intensidade da agglutinação.

A reacção agglutinante é, em summa, uma *reacção d'immunidade* e não *d'infecção* (como WIDAL a principio pretendia); mas, a agglutinação das bacterias representará um papel importante; indispensavel, na defesa do animal immunisado ou deverá considerar-se apenas como um phenomeno d'ordem secundaria, resultante da immunisação, mas não intervindo n'ella activamente?

GRUBER admite, na sua theoria da immunidadé, que as bacterias, só depois d'alteradas pelas substancias agglutinantes (*agglutininas, glabrinas* ou *glabrificinas*) poderão ser destruidas pelas alexinas; pelo contrario, BORDET, PFEIFFER e outros susten-

tam que a agglutinação não modifica a estrutura dos microbios nem influe no estado d'immunidade. N'um trabalho recente (1897), SALIMBENI julga poder concluir d'algumas experiencias que «a agglutinação, pelo menos para os vibriões cholericos, é um phenomeno que se produz exclusivamente fóra do organismo»; a esta conclusão, porém, oppõem-se experiencias anteriores de PFEIFFER com os bacillos da cholera e typhico.

Em qualquer das hypotheses (e não nos interessa discutil-as n'este momento) considera-se a reacção agglutinante, quando se manifeste com intensidade, como característica, *especifica* e utilizavel, portanto, não só para o diagnostico etiologico d'algumas infecções que, depois d'um primeiro ataque, conferem a immunidade, mas tambem para a distincção d'especies e variedades microbianas em culturas puras.

Para GRUBER as substancias agglutinante e bactericida do sôro não seriam identicas, attendendo a que as propriedades da primeira resistem ás temperaturas inferiores a 70° em quanto que as da segunda desaparecem pelo aquecimento a 60°; a razão invocada por GRUBER nada prova porque as propriedades d'uma substancia nem sempre se extinguem todas sob a influencia da mesma temperatura.

WIDAL e SICARD attribuem a acção agglutinante dos humores dos typhosos ás «substancias albuminoides, taes como o fibrinogeneo, a globulina e a caseina»; mas, se substancias tam diferentes

são dotadas da propriedade commum d'agglutinar os bacillos, porque não a manifestam senão nos typhosos?

Algumas experiencias que realisámos mostram que as nucleinas não são extranhas aos phenomenos de agglutinação pelos sôros.

Exp. XI — Em 3 tubos — A, B e C — contendo cultura de coli-bacillo de 24 horas em caldo de peptona, lançámos a solução, já indicada, de nucleina de sôro, d'ovo e de levadura na proporção de, respectivamente, 1 de soluto para 10 de cultura; passadas 4 horas, notava-se no fundo de cada tubo um precipitado consideravel e, em suspensão no liquido, uma tenue poeira, facil de distinguir da turvação uniforme do caldo d'uma cultura testemunha; no fim de 24 horas o precipitado era mais abundante, especialmente nos tubos B e A (nucleina d'ovo e de sôro) mas no liquido ainda se mantinham particulas solidas em suspensão. Nos tubos D e E, testemunhas, — o primeiro com cultura de coli-bacillo de 24 horas, a que adicionámos o soluto de potassa (0,15 %) na proporção de 1×10 , e o segundo com caldo de peptona, a que juntámos solução de nucleina d'ovo na mesma proporção, — não se produziu modificação sensivel.

Repetimos a experiencia com o vibrião de KOCH e o bacillo d'EBERTH, empregando d'este uma cultura de 48 horas e, d'aquelle, de 72 horas; a reacção agglutinante produziu-se com maior in-

tensidade do que nas culturas de coli-bacillo e por tal fórma que, nos tubos a que adicionámos a nucleina de sôro e a d'ovo, depois de 24 a 48 horas, o caldo tornou-se completamente limpido, como se tivéssemos operado com o sôro d'animaes immunisados.

Exp. XII—A 6 tubos d'ensaio, cada um com 10 c. c. de cultura de bacillo d'EBERTH de 48 horas em caldo de peptona, juntámos respectivamente 1 c. c., $\frac{1}{2}$ c. c., $\frac{1}{4}$ de c. c., $\frac{1}{8}$ de c. c., $\frac{1}{10}$ de c. c. e $\frac{1}{12}$ de c. c. de soluto de nucleina d'ovo; passadas 24 horas, todas as culturas apresentavam os signaes macroscopicos da reacção agglutinante mas, por exames repetidos ao microscopio, verificámos que os bacillos persistiam isolados, conservando os movimentos proprios, ainda que menos rapidos, e só muito excepcionalmente formavam grupos ou agglomerações características.

Os phenomenos d'agglutinação, observados nas experiencias precedentes, revestiram uma fórma inesperada e verdadeiramente notavel pelo contraste entre o aspecto macroscopico das culturas e o resultado da analyse microscopica: a simples inspecção das culturas levava a acreditar que se tratava d'uma reacção agglutinante typica, em tudo identica á dos sôros immunisantes; o exame microscopico denunciava, pelo contrario, a presença de bacillos livres, moveis e, só muito raras.

vezes, uma ou outra agglomeração característica. Poderão os sôros, em circumstancias especiaes, comportar-se d'uma maneira semelhante? Os trabalhos até hoje publicados, respeitantes ao sôro dos typhosos, não permitem responder pela affirmativa; mas, como essas investigações comprehendem um numero de casos ainda muito limitado, entendemos que a questão merece um estudo cuidadoso, não devendo por enquanto attender-se á recommendação d'alguns auctores para que na verificação clinica da reacção agglutinante se prescindia do exame microscopico.

As nossas experiencias demonstram, segundo cremos, que as nucleinas são as substancias agglutinantes do sôro normal; não póde, na verdade, objectar-se que ha uma grande desproporção entre a quantidade de sôro normal necessaria para produzir a agglutinação e a das soluções empregadas porque n'estas, não só a percentagem de nucleina era muito maior como, achando-se em estado de pureza, devia actuar com mais energia. Do mesmo modo, o facto da precipitação abundante dos bacillos coincidir com uma agglutinação pouco accentuada talvez se relacione com a ausencia dos albuminoides do sôro nos solutos de nucleina.

As propriedades agglutinantes dos sôros normaes e dos sôros immunisantes derivarão, porém, de substancias fundamentalmente differentes?

A especificidade da reacção agglutinante do sôro dos animaes immunisados não indica que os

principios que lhe dão origem sejam essencialmente diferentes dos que no sôro normal manifestam uma acção semelhante, mas menos intensa; é dos segundos que, verosimilmente, por modificações moleculares pouco profundas, resultam os primeiros, pertencendo uns e outros, pela analogia da sua constituição, ao mesmo agrupamento chimico.

Na opinião d'alguns investigadores, as soluções de nucleina ou d'acido nucleinico, applicadas em injeccão hypodermica nos animaes, augmentam o numero de globulos brancos do sangue. Para verificar esta acção das nucleinas (que, muito indirectamente, pôde considerar-se como bactericida e, portanto, figurar devidamente n'este capitulo) procedemos á numeração dos globulos brancos do sangue extrahido das veias da orelha de dois coelhos *novos* e de dois coelhos a que, durante 10 dias consecutivos, haviamos injectado no tecido cellular subcutaneo 1 c. c. de solução de nucleina d'ovo a 1×100 ; tanto n'uns como n'outros animaes, a media do numero de leucocytos oscillava entre 12.000 e 15.000 por millimetro cubico de sangue. Reconhecemos que o resultado d'esta experiencia não se oppõe em absoluto á existencia da referida propriedade das nucleinas, não só pela pequena quantidade de substancia injectada e o tempo curto da sua applicação, como pela differença consideravel do numero de globulos brancos que se nota de animal para animal.

III

Nucleinas e substancia bactericida do sôro

Na primeira parte d'este estudo (pag. 33 e seg.), analysando uma serie de trabalhos experimentaes de auctores de reconhecida competencia, démos a demonstração formal e positiva da existencia de propriedades bactericidas no sôro de quasi todos os animaes; no capitulo precedente, baseados em experiencias proprias, mostrámos por fórma não menos evidente que a nucleína de sôro exercia uma acção antiseptica notavel. Da approximação dos dois factos resalta natural e immediatamente a conclusão de que é ás nucleinas que os sôros devem as suas propriedades bactericidas; esta conclusão, mais se justifica e avigora, pelo exame, ainda que summario, dos elementos constitutivos da questão.

Nas investigações relativas á substancia bactericida do sôro (pag. 85 e seg.) manifesta-se uma divergencia completa d'opiniões, salvo pelo que

respeita á sua natureza proteica. BUCHNER, identificando-a com toda a sôro-albumina, collocou-se, como vimos, n'uma posição insustentavel perante o resultado das suas proprias experiencias; e, DUCLAUX, emittindo a hypothese de que se tratava d'uma diastase, não attendeu ao contraste entre a intensidade d'acção d'aquella, proporcional á quantidade, e a actividade especial, caracteristica, dos fermentos soluveis. Para HANKIN, a acção microbida do sôro seria devida á *cell-globulina* de HALLIBURNTON OU a um *corpo analogo*; ora, como as *cell-globulinas* de HALLIBURNTON não são mais do que nuclealbuminas (GAUTIER) podemos, sem sacrificio da nossa, acceitar a opinião do auctor. Das substancias isoladas por OGATA e JASUHARA bastará lembrar que nem as suas propriedades microbidas foram reconhecidas por outros investigadores nem o processo de preparação adoptado prevenia n'ellas a presença de nucleinas; é ainda a esta ultima circumstancia que verosimilmente pôde attribuir-se a acção antiseptica das substancias extrahidas por CHRISTMAS das visceras de coelhos.

Os trabalhos dos auctores precedentes não invalidam, em summa, a conclusão que acima formulámos: as substancias por elle consideradas como identicas ao principio bacterida do sôro ou possuíam propriedades em opposição manifesta com as d'este ou continham nucleinas e, n'este caso, a ellas deviam a sua acção antiseptica.

Admittindo que as nucleinas são as substancias bacteridas dos sôros, é evidente que, sob a

influencia do mesmo agente, as suas propriedades poderão modificar-se d'uma maneira differente segundo o meio em que se encontrarem. O sôro perde a actividade microbicida pelo aquecimento a 60°; acontecerá o mesmo ás nucleinas dissolvidas no soluto de potassa? Não havia necessidade de recorrer á experiencia, como fizemos, para responder pela negativa: nas soluções alcalinas, as nucleinas podem na verdade decompôr-se pelo calor mas, d'essa decomposição, resultam principalmente acidos nucleinicos, isto é, substancias reconhecidamente antisepticas. No sôro, pelo contrario, em presença d'outros albuminoides e por effeito da elevação de temperatura, as nucleinas transformam-se em nucleoalbuminas inactivas, dependendo, portanto, a suppressão do poder bactericida mais da composição do meio, como alguns auctores têm sustentado, do que propriamente da instabilidade do principio microbicida.

Os restantes caracteres da substancia microbicida do sôro, postos em evidencia pelas experiencias que referimos na primeira parte d'este trabalho, harmonizam-se perfeitamente com as propriedades chemicas das nucleinas; d'entre elles, seja-nos permittido recordar, pela sua importancia, a influencia da alcalinidade do sangue sobre a sua energia antiseptica e sobre a resistencia dos animaes á infecção, influencia que se explica satisfactoriamente pela solubilidade das nucleinas augmentar com a alcalinidade do sôro.

Se descermos á analyse dos phenomenos da

infecção, a propria phagocytose nos proporcionará razões para considerar as nucleinas como substancias anti-bacillares e de defesa do organismo. As bacterias englobadas pelas cellulas conservam-se quasi sempre afastadas dos nucleos, isto é, dos elementos mais ricos em nucleina, não os atacando senão depois da morte e dissociação dos phagocytos. Esta *incompatibilidade* dos nucleos e dos microbios mais se accentua nas infecções bem estudadas sob o ponto de vista das reacções cellulares, como por ex., na tuberculose: nas cellulas gigantes, que convêm particularmente para a observação do phenomeno pela abundancia de nucleos e de bacillos, vemos que se os primeiros occupam um polo da cellula, os segundos encontram-se quasi sempre no polo opposto; outras vezes, os bacillos rodeiam por todos os lados os nucleos e vice-versa, ficando entre uns e outros uma zona livre de organitos. A que attribuir a invulnerabilidade dos nucleos pelos bacillos senão á presença d'uma substancia antiseptica que lhes é propria, d'uma nucleina?

Dissémos (pag. 65) que a ausencia de propriedades microbidas no sôro do boi podia ser util para a caracterização das substancias que tornam antisepticos os outros sôros; na verdade, se taes substancias são nucleinas, ou não existem no sôro d'aquelle animal ou apresentam-se sob uma fórmula differente. Na primeira hypothese, a digestão artificial do «sôro precipitado» não deve deixar residuo insolúvel no liquido pepsico; na segunda, a nu-

cleina isolada talvez manifeste propriedades químicas especiaes, faceis de reconhecer. Para resolver a questão, procedemos á experiencia seguinte, tentando ao mesmo tempo verificar se a temperatura e a presença de bacterias influencia na quantidade de nucleina do sôro de boi.

Exp. XIII—Applicámos o processo de preparação da nucleina de sôro, já indicado (pag. 108), a —

— a) 400 c. c. de sôro normal de boi ;

— b) 300 c. c. de sôro de boi aquecido a 65° durante 40 minutos ;

— c) 200 c. c. d'uma cultura de coli-bacillo de 20 horas em sôro de boi, filtrada por algumas folhas de papel.

Depois de 7 dias de digestão, pela pepsina, do «sôro precipitado», notava-se realmente em todos os frascos um residuo insolúvel, mas em quantidade tam pequena que não conseguimos por filtração separal-o do liquido.

N'esta experiencia, a parte do precipitado não atacada pelo liquido digestivo era constituída verosimilmente por nucleina ; e, ainda que não chegassemos a pesal-a, não temos duvida em affirmar que a sua percentagem no sôro de boi é muito inferior á de substancias analogas nos sôros de coelho e de cabra.

Verificar-se-á a mesma differença para todos os outros sôros microbicidas ?

A maior diluição das nucleinas no sôro de boi explica a maneira especial como elle se comporta perante as bacterias; entretanto, a dependencia dos dois phenomenos tornar-se-á certa ou, pelo menos, muito provavel sómente depois de averiguar-se que aquella nucleina possui, como as outras, propriedades antisepticas. Da experiencia precedente julgâmos poder tambem concluir que a temperatura de 65° e a presença de microbios não influem consideravelmente na quantidade de nucleina do sôro de boi.

Outras experiencias, conduzidas por uma fórma diversa, poderiam servir igualmente para a identificação das nucleinas com as substancias bactericidas do sôro; se, contra o nosso desejo, não as realizâmos, foi isso devido exclusivamente á pequena porção de sôro de que dispunhamos.

E' por demais evidente, para que seja necessario insistir sobre o facto, que, adquirindo os sôros, por effeito da immunisação, uma actividade microbicida especifica, as nucleinas deverão soffrer modificações particulares na sua constituição molecular, de maneira a reagirem especialmente contra uma determinada especie microbiana; fóra do estado d'immunidade natural, artificial ou adquirido, as differenças no poder antiseptico dos sôros podem em parte explicar-se pela quantidade de nucleina em dissolução.

IV

Tentativas d'immunisação e tratamento das infecções pelas nucleinas

Processos geraes de defesa do organismo na infecção. — A larga disseminação dos microbios virulentos no meio exterior assegura-lhes uma convivencia intima com o homem, convivencia que d'um momento para o outro póde transformar-se em perigosa hospedagem se o revestimento epithelial protector, devido a circumstancias multiplas, lhes facultar uma porta d'entrada na economia.

Transposta pelas bacterias a barreira epithelial, logo se manifestam na parte invadida phenomenos reaccionaes tam complexos quanto variaveis, provocados pela presença dos organitos extranhos e dos seus productos toxicos, pela subtracção de substancias destinadas á nutrição dos tecidos, etc.; o conjuncto d'estas desordens, quer se limitem ao ponto primeiro lesado quer se propaguem a outros e se generalizem, constitue a infecção.

Se as bacterias não encontrassem no organismo condições desfavoraveis ao seu desenvolvimento é evidente que, dispondo d'alimentos em excesso, d'uma temperatura optima e de humidade conveniente, depressa multiplicariam as suas legiões, espalhando-se pelos tecidos e aniquilando todos os elementos anatomicos; d'esta maneira, a morte seria a consequencia inevitavel de qualquer infecção abandonada á *natureza medicatriz*. O organismo não offerece, porêm, um terreno adequado ao seu desenvolvimento nem assiste passivamente á invasão d'elementos extranhos, mas reage e lucha pela sua integridade.

Quaes são, pois, os meios geraes de defesa do organismo durante a infecção?

A interrogação que acabâmos de formular constitue um dos problemas mais importantes da pathologia, ainda hoje sem uma solução rigorosa, precisa e bastante evidente para conciliar todas as opiniões, mas incomparavelmente esclarecido pelo enorme contingente de factos que pouco a pouco têm substituido as suas incognitas.

Para o fim que visâmos, não carecemos de analysar separadamente as numerosas theorias propostas para explicar a resistencia dos animaes á infecção: as theorias humoraes, cellulares e cellulo-humoraes.

A base das theorias humoraes é já hoje inabalavel: as bacterias, penetrando nos tecidos, soffrem immediatamente a acção dos liquidos da economia e, só mais tarde, a influencia dos elementos cellu-

lares; ora, como já demonstrámos, aquelles liquidos possuem propriedades antisepticas e, facto notavel, em geral tanto mais accentuadas quanto maior é a resistencia do animal á infecção. Nos animaes naturalmente refractarios, a energia bactericida dos humores conserva-se por assim dizer em estado latente, mas prompta a desenvolver-se por uma fôrma ostensiva se o organismo fôr invadido por um numero consideravel de microbios; podemos comparar, á maneira de DENYS, o animal refractario a uma nação sem exercito permanente mas que, atacada pelo inimigo, arma n'um instante as suas reservas, oppondo uma resistencia invencivel. Depois da vaccinação ou d'uma infecção immunisante, a intensidade da acção microbicida especifica dos humores vai diminuindo lentamente, sendo esta diminuição, como ha pouco, mais apparente do que real porque no momento d'uma nova infecção reaparece a energia primitiva. O estado bactericida dos humores revela-se algumas vezes com particular nitidez na immuniidade *activa* (como se observa, por ex., no «phenomeno de PFEIFFER») e é bastante para destruir em pouco tempo as bacterias sem a intervenção directa das cellulas. Nos animaes immunisados contra a diphteria e contra o tetano, embora o sôro não seja destituido de propriedades microbicidas especificas, como NICOLAS demonstrou para o bacillo da diphteria, a sua acção principal e verdadeiramente caracteristica é a antitoxica; porêm, n'estes casos, trata-se

d'uma immuniidade especial e muito differente das outras, d'uma immuniidade *d'intoxicação* e não *d'infecção*. Inoculando o bacillo de LOEFFLER ou o de NICOLAIER n'um animal previamente immunisado contra a diphteria ou contra o tetano, a infecção realiza-se, os bacillos persistem vivos por bastante tempo e continuam a elaborar toxinas mas os effeitos d'estas são neutralizados pelas antitoxinas; se, pelo contrario, inocularmos o vibrião de KOCH, o bacillo de DAVAINÉ, d'EBERTH, etc., em animaes immunisados respectivamente contra as infecções cholericas, carbunculosa, typhica, etc., os bacillos desapparecem rapidamente mas as suas toxinas determinam uma intoxicação como nos animaes não immunisados. A theoria das antitoxinas explica apenas a immuniidade d'intoxicação emquanto que as outras theorias do estado bactericida dos humores são applicaveis á immuniidade d'infecção (immuniidade natural, artificial, adquirida por infecção previa ou por vaccinação) e á maior ou menor resistencia natural ás bacterias, constante em todos os animaes.

Na defesa do organismo infectado, ao lado do estado bactericida dos humores devemos ordenar o phagocytismo.

A METCHNIKOFF cabe innegavelmente a gloria de pela primeira vez ter posto em evidencia o phagocytismo como um meio de defesa do organismo porque se antes d'elle outros investigadores (MEISSER, KOVALEWSKY, PFEIFFER, etc.) notaram presença

de bacterias no interior das cellulas, não ligaram importancia ao phenomeno.

A theoria da phagocytose ganhou desde o principio partidarios fervorosos e intransigentes que muito contribuíram para a sua vulgarização; entretanto, as objecções que tem levantado e, depois de conhecidas as propriedades bactericidas dos humores, ainda continua a suscitar, não podendo derrubal-a, oppõem-se ao exclusivismo que o auctor pretende imprimir-lhe.

A presença de bacterias no interior dos leucocytos e das cellulas d'alguns tecidos observa-se regularmente em muitas infecções; a theoria da phagocytose exige, porém, que as cellulas se apoderem dos microbios ainda vivos e em seguida os destruam e digiram. A circumstancia dos bacillos retidos pelos phagocytos fixarem os corantes não prova seguramente que elles se conservem vivos. Os movimentos das bacterias no interior das cellulas, que alguns auctores allegam como signaes evidentes da sua vitalidade, prestam-se a interpretação diversa: os movimentos lentos podem ser-lhes transmittidos pelo protoplasma cellular e, os rapidos, não se comprehende que, n'um meio como o protoplasma, emanem das bacterias.

Estas objecções caem perante alguns factos da observação de METCHNIKOFF e d'outros bacteriologistas, como, por ex., a reproducção dos microbios no interior dos leucocytos, em virtude da qual o globulo fende, *estala*, e projecta o con-

teúdo no liquido ambiente; mas, n'este caso, em vez dos phagocytos destruirerem e digerirem os microbios, são estes que, pelo contrario, matam e assimilam as cellulas. A victoria dos microbios sobre as cellulas parece, por outra parte, a consequencia necessaria da sua organização especial, que lhes permite fabricar substancias toxicas e resistir ás influencias mais violentas, como as temperaturas extremas, a dessecação, a falta d'alimentos, etc.

Para mostrar o pouco valor dos argumentos que vimos reproduzindo e d'outros que se têm invocado contra a theoria da phagocytose basta recordar que, muitas vezes, os microbios que nadam livremente n'um exsudato inflammatorio apresentam-se sem signaes de degenerescencia ao passo que, no interior dos phagocytos, encontram-se em todas as phases de desorganização; portanto, estas alterações das bacterias representam o effeito e não a causa do seu englobamento pelas cellulas.

O englobamento dos microbios pelas cellulas é um facto incontestavel mas, a intensidade da phagocytose e a sua efficacia como meio de defesa do organismo, depende especialmente do estado bactericida dos humores. Esta dependencia resalta nitidamente das experiencias de DENYS e LECLEF (1895) sobre a immunidad artificial contra o streptococco, experiencias que, pela sua originalidade e precisão, merecem particular referencia.

Para obter leucocytos em grande quantidade, os auctores injectavam culturas esterilizadas de

staphylococcus na cavidade pleural de coelhos; no dia seguinte, o exsudato que enchia a cavidade era submettido á centrifugação, os globulos separados e lavados no sôro. A necessidade de desembaraçar completamente os leucocytos da parte liquida do exsudato provém d'esta possuir propriedades microbicidas accentuadas; por outra parte, os leucocytos conservam-se vivos depois da lavagem no sôro. Semeando o streptococco no sôro de coelho *novo* contendo globulos de coelho *novo*, os leucocytos podem, quando em numero consideravel, impedir a multiplicação dos microbios e ainda destruir alguns; o resultado é precisamente identico se juntarmos ao sôro leucocytos d'animal immunisado. Operando, pelo contrario, com sôro de coelho vaccinado, os leucocytos d'animal *novo* não só impedem a pullulação do streptococco por todo o tempo que permanecerem vivos mas tambem a diminuição do numero de colonias nas placas indica uma destruição intensa dos micrococcus; a phagocytose dos leucocytos é muito activa e, a sua sobrevida, notavel relativamente á dos globulos em suspensão no sôro d'animal *novo*. O resultado é ainda identico empregando globulos de coelho vaccinado. «*Os globulos V (d'animal vaccinado) devem o seu poder phagocytario ao sôro V. Postos no sôro N (d'animal novo), não gosam de nenhum poder especial. Os globulos N ganham todo o poder dos globulos V no sôro V.*».

A actividade adquirida pelos phagocytos no

sôro antistreptococcico não é um facto isolado: observam-se phenomenos analogos no sôro d'animaes immunisados contra o pneumococco (MENESSE, 1896), o coli-bacillo, etc.

Para verificar no organismo o resultado das experiencias precedentes, DENYS e LECLEF inocularam o streptococco na orelha e na pleura de coelhos *novos* e vaccinados; n'uns como n'outros os globulos brancos affluiram em numero sensivelmente igual mas, emquanto que nos primeiros os leucocytos permaneciam como simples espectadores do inimigo que pullulava livremente, nos segundos os phagocytos depressa englobavam todos os microbios.

A analyse muito summaria que acabâmos d'esboçar d'alguns dos factos em que se appoiam as theorias humoraes e cellulares convence-nos de que, d'uma maneira geral, a defesa do organismo na infecção não resulta exclusivamente nem do estado bactericida dos humores nem do phagocytismo; os humores iniciam a destruição dos microbios e os phagocytos em regra completam-na.

Tentativas d'immunisação e tratamento pelas nucleinas.—São obvias e resaltam de quanto havemos escripto as razões que nos levaram a applicar as nucleinas na immunisação e tratamento d'animaes infectados.

Para combater radical e racionalmente as doen-

ças microbianas internas, para seguir as prescrições da therapeutica pathogenica, ha necessidade de preencher em primeiro logar duas indicações principaes: elevar o poder bactericida dos humores e activar a phagocytose. Os antisepticos actualmente empregados não satisfazem a primeira indicação e quasi sempre se oppõem á segunda: depois de absorvidos, formam combinações diversas, perdem as propriedades microbicidas ou actuam indistinctamente sobre as cellulas vegetaes e animaes, perturbam as funcções da economia, irritam os orgãos d'eliminação, compromettem, emfim, a defesa natural do organismo a troco d'um allivio momentaneo e illusorio do doente, d'uma diminuição desnecessaria da temperatura e d'outros effeitos d'utilidade duvidosa. Não dispomos igualmente de medicamentos que excitem a phagocytose d'uma maneira directa, constante e efficaç; por outra parte, os trabalhos de DENYS, MENESSE, etc., provam que a actividade da phagocytose (pelo menos em muitas circumstancias) obedece ao poder microbicida dos humores.

No estado bactericida dos humores reside, pois, a indicação suprema da therapeutica das infecções internas; ora, para augmentar a acção antiseptica dos liquidos da economia sem alterar as suas qualidades nutritivas, poderá porventura encontrar-se agente mais adequado que a propria substancia que naturalmente lhes confere aquella actividade?

As nucleinas não offerecem nenhum dos inconvenientes dos outros antisepticos ; introduzidas no organismo, talvez se transformem em nucleoalbuminas mas, se estas não possuirem propriedades microbidas, evitam pelo menos que uma parte das nucleinas emanadas das cellulas soffra identica transformação, tornando-se inactiva. As nucleinas podem ainda fornecer ás cellulas o acido nucleinico que, na opinião de KOSSEL, é a substancia microbida dos phagocytos.

Mas, se em taes antisepticos vemos tantas virtudes therapeuticas e nenhuns effeitos nocivos, urge declarar que nos referimos principalmente ás nucleinas tal como se encontram no organismo e não ás que, pelos processos chimicos ordinarios, podem extrahir-se das cellulas vegetaes ou animaes: preparadas quer por digestão artificial quer por dissolução nos alcalis e precipitação pelos acidos, as nucleinas não conservam evidentemente a constituição molecular primitiva e, como se deduz das nossas experiencias com o sôro, as suas propriedades microbidas attenuam-se ; mais profundas deverão ser as alterações se, recorrendo aos mesmos processos, tentarmos isolar as que nos animaes immunisados manifestam uma actividade bactericida *especifica*.

Apesar d'estas nucleinas não corresponderem ás que existem normalmente no organismo e, empregando a de levadura de cerveja, que d'ellas mais deve distanciar-se, VAUGHAN conseguiu immunisar alguns animaes contra o pneumococco de

FRAENKEL e o bacillo de KOCH, evitando n'outros o desenvolvimento da tuberculose quando a applicação do medicamento seguia de perto (alguns dias) a inoculação da cultura; na tuberculose incipiente do homem, o auctor julga ter colhido beneficios do tratamento pelas nucleinas, mas não são elles tam nitidos que não permittam attribuir-se-lhes outras causas.

As nossas tentativas d'immunisação e tratamento pelas nucleinas não foram seguidas d'exitos e porisso apenas merecem ligeira referencia. Experimentámos em 11 porquinhos da India e 21 coelhos, parte dos quaes submettemos durante 15 a 20 dias a uma injeccção diaria, subcutanea ou intra-venosa, de 1 c. c. de solução de nucleina de sôro ou d'ovo e, em seguida, procedemos á inoculação subcutanea, intra-venosa, na cavidade peritoneal ou na camara anterior dos bacillos de KOCH e de DAVAINE (1); nos restantes, inoculámos previamente as mesmas culturas e applicámos depois, por igual fórma, uma injeccção quotidiana de 1 c. c. de soluto de nucleina. Os animaes que receberam as nucleinas assim como os animaes testemunhas morreram n'um periodo de tempo sensivelmente igual. Para o insuccesso completo d'estas tentati-

(1) No coelho apenas recorremos á inoculação intra-venosa do bacillo de KOCH e, em dois casos, á inoculação na camara anterior mas, n'estes, contra o que podia esperar-se, a infecção generalizou-se e os animaes morreram antes de apparecerem tuberculos na iris, reconheciveis macroscopicamente.

vas devia ter concorrido poderosamente a má escolha do vehiculo das nucleinas (solução de hydrato de potassa), a inoculação de grandes quantidades de cultura e a conhecida rebeldia das referidas infecções.

ADDITAMENTO

ADDITIONAL

ADDITIONAL

ADDITAMENTO

Tendo-nos dirigido, em janeiro do corrente anno, ao illustre professor de hygiene e chimica physiologica da Universidade de Michigan, e director do Laboratorio d'hygiene, Mr. Victor C. Vaughan, Ph. D., M. D., pedindo-lhe que nos informasse especialmente ácerca dos resultados obtidos no tratamento da tuberculose pelas nucleinas, só recebemos a amabilidade da resposta depois de terminada a impressão do nosso estudo. Aquelle illustre professor retardou os esclarecimentos pedidos, para poder enviar-nos a sua ultima publicação: *The physiological action and therapeutic uses of yeast nucleinic acid, with special reference to its employment in tuberculosis. March, 1897.* Sentindo não podermos n'este momento fazer maiores referencias a este trabalho, limitâmo-nos a transcrever o summario dos casos de tuberculose tratados pela nucleina:

Summary. — The cases reported in this and the preceding paper include all those in which the tubercle bacillus was found, treated by me with yeast nucleinic acid, from May, 1893, to December, 1895. There has

been no selection of cases to report, and no exclusion. Many were in the last stages of the disease when the treatment was begun. Indeed, some of them were at that time confined to their rooms, and died within a few weeks. In my study of the value of yeast nucleinic acid in the treatment of tuberculosis, I have endeavored to carry out the investigation as I would a series of laboratory experiments and, above all, not to deceive myself. Of the seventy-six cases reported, seventy are those of pulmonary tuberculosis. Of these, thirty ($42\frac{4}{7}$ per cent.) have died. Of these, at least nine were temporarily benefited.

Of the seventy, seventeen ($24\frac{2}{7}$ per cent.) have been continuously free from the bacillus for from one month to two and one-half years, so far as can be determined from the sputum; *i. e.*, either there has been during this time no sputum to examine or that examined has failed to reveal the bacillus. To the best of my knowledge, another (No. 47) has been free from the bacillus for more than a year, and another (No. 29) has been free from the bacillus with the exception of a short time, and still another (No. 24) was free when last examined. Twenty ($28\frac{4}{7}$ per cent.) were still infected at the last examination. Of these, sixteen have been apparently improved by the treatment. It should be stated that none of these were hospital cases. I was not able to control their diet. Most of them were not rich, and had only inexpensive food. The hygienic conditions under which many of them have lived have not been satisfactory.

Of the five cases of urinary tuberculosis, four have apparently been cured. One was temporarily benefited, but developed acute miliary tuberculosis and died. The one case of joint tuberculosis has been benefited.

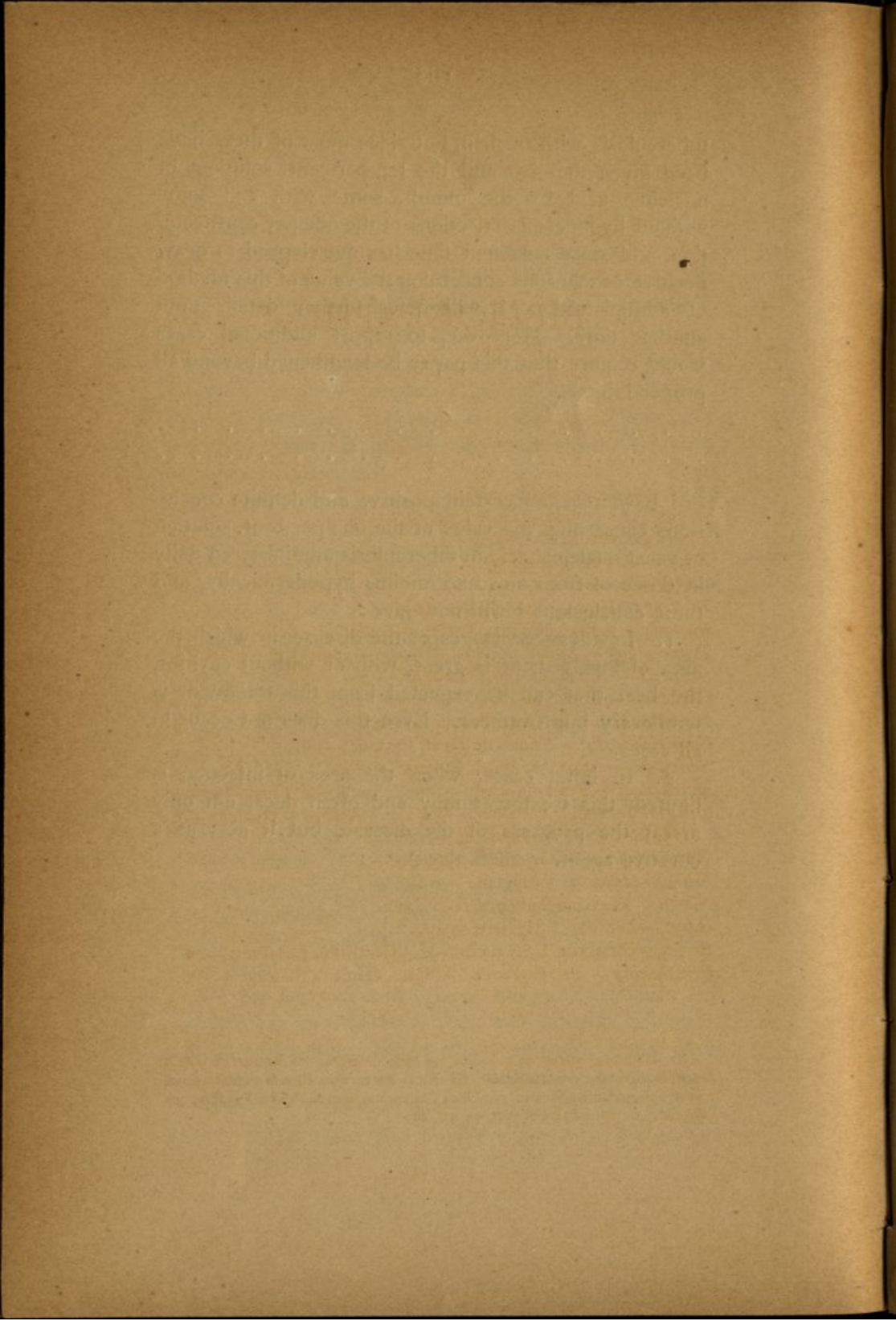
Since the first of January, 1896, I have treated between thirty and forty additional cases of pulmonary

tuberculosis with nuclein, but since most of these have been given the five and the ten-per-cent. solutions of nucleinic acid by the mouth, some with and some without hypodermic injections of the one-per-cent. solution, and since sufficient time has not elapsed to draw positive conclusions concerning the value of this method of administration, I will defer further details until another time. Moreover, to report additional cases would require that this paper be lengthened beyond all proper limits.

.
.

I have reached certain positive and definite conclusions concerning the value of the one-per-cent. solution of yeast nucleinic acid in tuberculosis administered daily in doses of from 60 to 80 minims hypodermically, and these conclusions I will now give:

1. In advanced stages of the disease, in which the area of involvement is great, with or without cavities, the best that can be expected from this treatment is temporary improvement. Even this does not occur in all cases.
2. In initial cases, when the area of infection is limited, this treatment may and often does, not only arrest the progress of the disease, but it acts as a curative agent.



BIBLIOGRAPHIA ⁽¹⁾

- A. Bastin* — La cellule — 1892.
Denys — La cellule — 1893, 1894, 1895.
Havet — La cellule — 1894.
Kaisin — La cellule — 1893.
Leclef — La cellule — 1894, 1895.
H. Van de Velde — La cellule — 1894.
Duclaux — Annal. de l'Inst. Pasteur — 1889.
Trapeznikoff — Annal. de l'Inst. Pasteur — 1891.
Sanarelli — Annal. de l'Inst. Pasteur — 1893.
Christmas — Annal. de l'Inst. Pasteur — 1891.
Bordet — Annal. de l'Inst. Pasteur — 1895.
Gabritschewsky — Annal. de l'Inst. Pasteur — 1894.
Salimbeni — Annal. de l'Inst. Pasteur — 1897.
Metchnikoff — Semaine méd. — 1892. Annal. de l'Inst. Pasteur.
Fodor — Centralbl. f. Bakter. — VII, XVII. Archiv. f. Hygiene — IV.
Deutsch. med. Wochenschr. — 1887.
Wyssokowitsch — Zeitschr. f. Hygiene — I.
Nuttal — Zeitschr. f. Hygiene — IV.
Nissen — Zeitschr. f. Hygiene — VI, VIII.
Bitter — Zeitschr. f. Hygiene — XII.
Bering — Zeitschr. f. Hygiene — IX. Centralbl. f. Bakter. — IX.
Pekelharing — Semaine méd. — 1892. Ziegler's Beiträge — VIII.

(1) Indicámos apenas os trabalhos que mais elementos nos forneceram para o assumpto especial d'esta dissertação. Os artigos das revistas allemãs citadas, encontram-se summarizados nos *Annal. de l'Inst. Pasteur*, no livro de Novy e Vaughan, que tambem citámos, no *British Med. Journal*, etc.

- Buchner* — Centralbl. f. Bakter. — v, vi, xii. Archiv. f. Hygiene — x, xii. Münch. med. Wochenschr — 1889.
- Ogata, Jasuhara* — Centralbl. f. Bakter. — ix.
- Hankin* — Centralbl. f. Bakter. — ix, xii.
- Emmerich, Tsuboi, Steinmetz, Löw* — Centralbl. f. Bakter. — xii.
- Charrin et Roger* — Acad. des sc. — 1889.
- Roger* — Soc. de biolog. — 1889, 1890, 1892. Rev. de méd. — 1892. Presse méd. — 1895.
- Courmont* — Archiv. de physiol. — 1895.
- Nicolas* — Pouvoir bactér. du sérum antidiphthér. — 1895.
- Koudrevetzký* — Arch. de méd. exp. — 1893.
- Calabrese* — Riforma med. — 1894. Cong. ital. de med. int. — 1895.
- Halliburton* — Physiological Chemistry — 1891.
- Garnier et Schlagdenhauffen* — Encyclop. chim. de Fremy — t. ix.
- Lambling* — Encyclop. chim. de Fremy — t. ix.
- Bunge* — Chim. biol. et pathol. — 1891.
- A. Gautier* — Cours de chimie — t. iii, 1892.
- » — Les toxines microbiennes et animales — 1896.
- » et *Arthus* — Chim. physiol. et pathol. — 1897.
- Vaughan and Novy* — Ptomaines, leucomaines, toxins and anti-toxins — 1896.
- McClintock, Novy, Vaughan* — Medical news — 1893, 1894.
- O. Hertwig* — La cellule et les tissus — 1894.
- Delage* — Structure du protoplasma et theor. sur l'hérédité — 1895.
- Gruber* — Cong. allem. de méd. int. — 1896.
- Menesse* — Cong. franc. de méd. int. — 1896.
- Widal* — Soc. de biol. — 1896, 1897.
- » et *Sicard* — Acad. de méd. — 1896.

INDICE

	Pag.
Introdução	1

PRIMEIRA PARTE

PROPRIEDADES BACTERICIDAS DO SÔRO

I — Propriedades bactericidas do sôro e dos humores do organismo	33
II — Propriedades bactericidas do sôro e dos humores dos animaes immunisados	69
III — Poder bactericida e alcalinidade do sôro	79
IV — Substancia bactericida do sôro	85

SEGUNDA PARTE

NUCLEINAS

I — Origem, composição, preparação e propriedades das nucleinas	101
II — Propriedades bactericidas das nucleinas	117
III — Nucleinas e substancia bactericida do sôro	139
IV — Tentativas d'immunisação e tratamento pelas nucleinas	147
Additamento	161
Bibliographia	165

INDEX

Introduction 1

Chapter I 10

Chapter II 25

Chapter III 45

Chapter IV 65

Chapter V 85

Chapter VI 105

Chapter VII 125

Chapter VIII 145

Chapter IX 165

Chapter X 185

Chapter XI 205

Chapter XII 225

Chapter XIII 245

Chapter XIV 265

Chapter XV 285

Chapter XVI 305

Chapter XVII 325

Chapter XVIII 345

Chapter XIX 365

Chapter XX 385

Chapter XXI 405

Chapter XXII 425

Chapter XXIII 445

Chapter XXIV 465

Chapter XXV 485

Chapter XXVI 505

Chapter XXVII 525

Chapter XXVIII 545

Chapter XXIX 565

Chapter XXX 585

Chapter XXXI 605

Chapter XXXII 625

Chapter XXXIII 645

Chapter XXXIV 665

Chapter XXXV 685

Chapter XXXVI 705

Chapter XXXVII 725

Chapter XXXVIII 745

Chapter XXXIX 765

Chapter XL 785

Chapter XLI 805

Chapter XLII 825

Chapter XLIII 845

Chapter XLIV 865

Chapter XLV 885

Chapter XLVI 905

Chapter XLVII 925

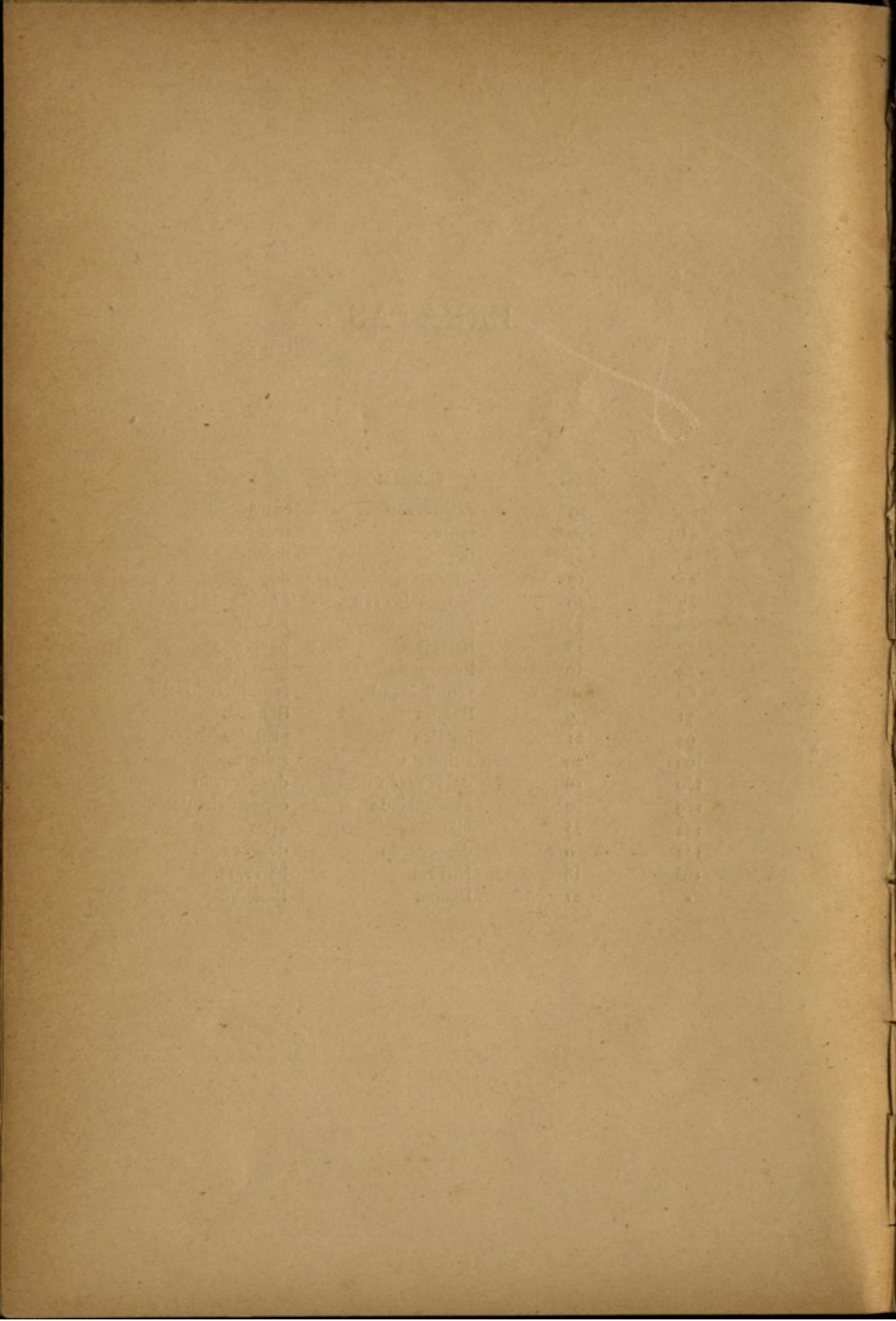
Chapter XLVIII 945

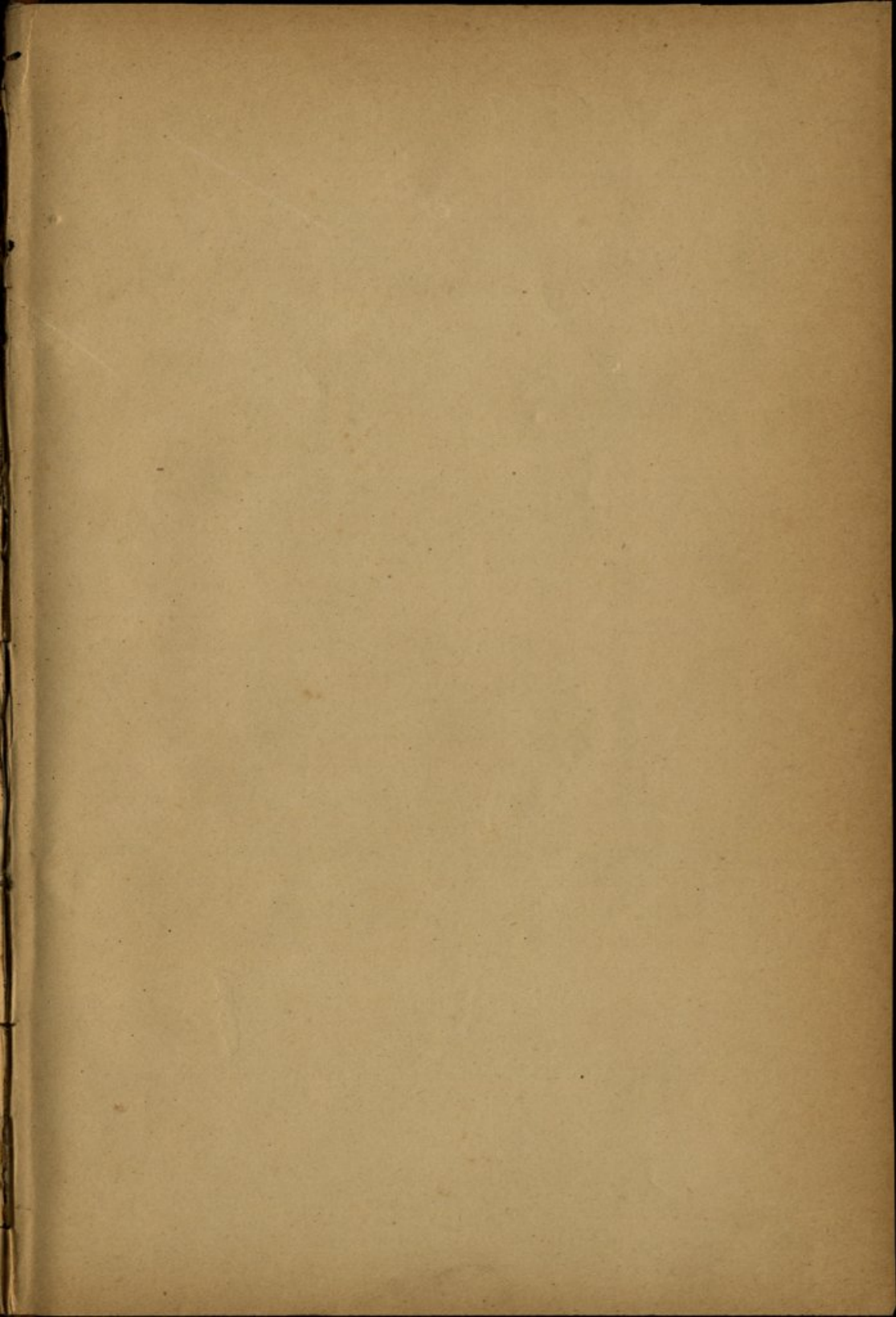
Chapter XLIX 965

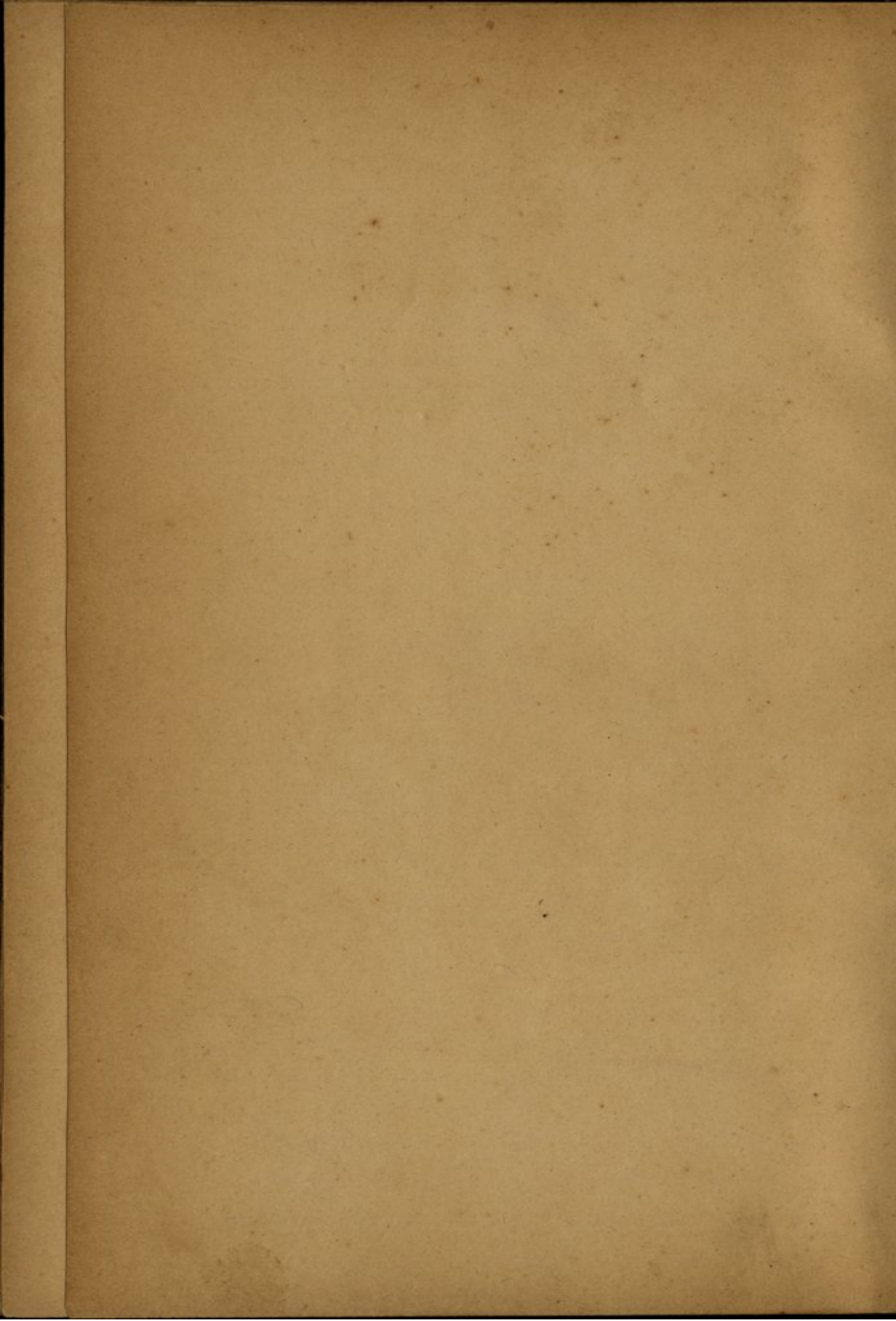
Chapter L 985

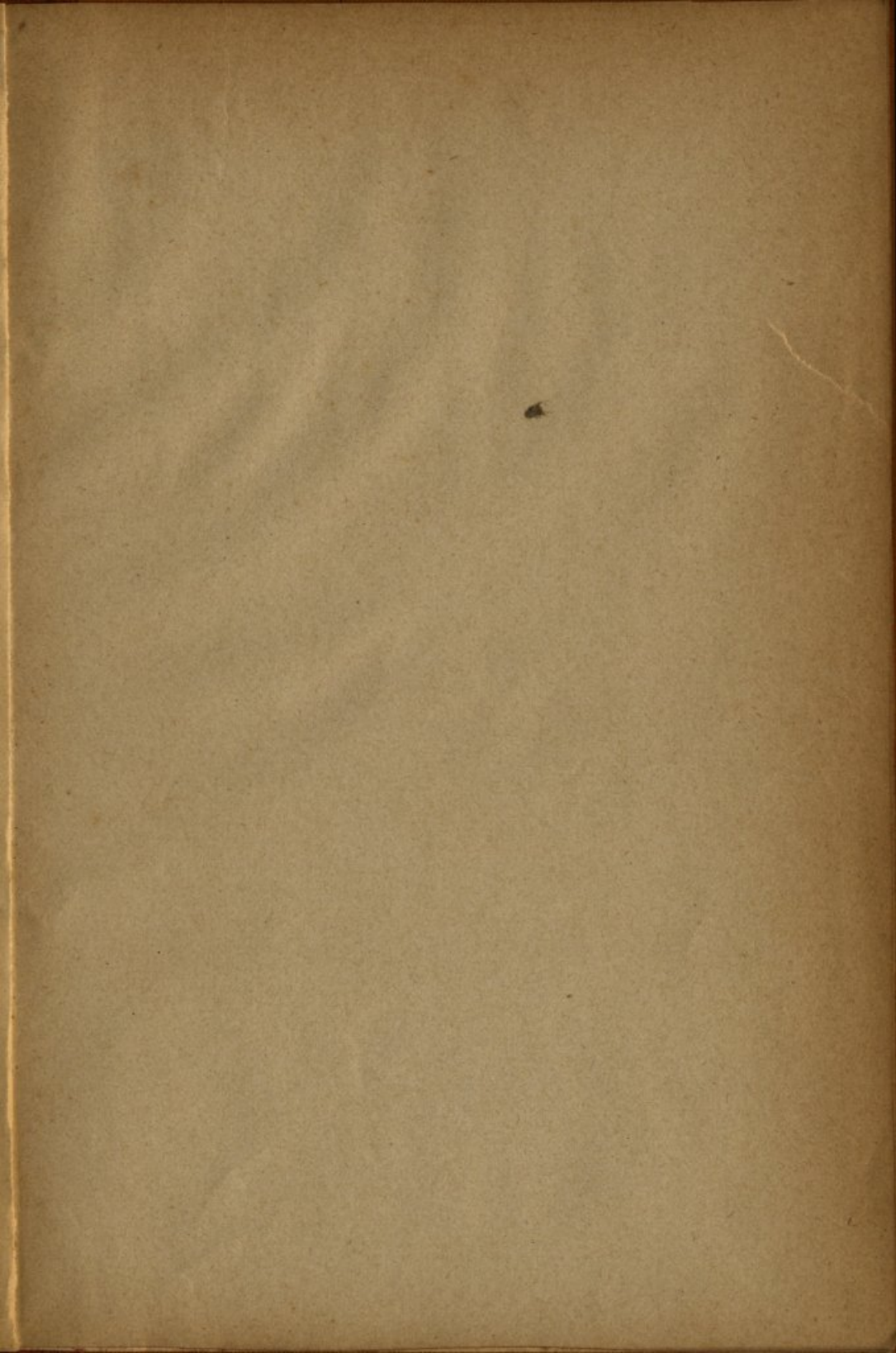
ERRATAS

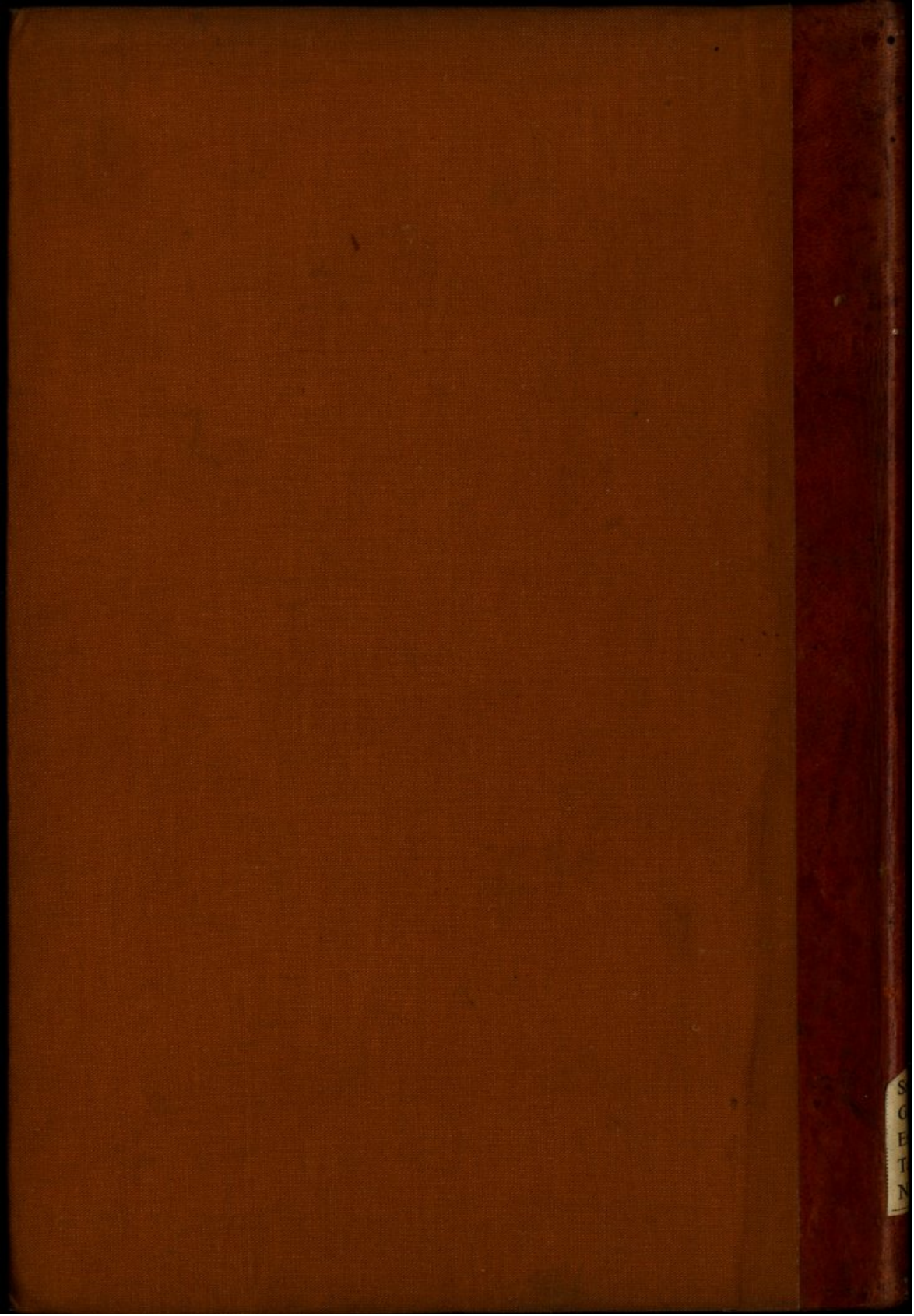
Pag.	linhas	onde se lê	leia-se
38	29	extravazão	extracção
41	20	tanta	tanto
»	27	lhe	lhes
42	17	de	do
47	29	sangue JETTER	sangue. JETTER
48	25	apezar	apesar
57	13	baterias	bacterias
59	10	homores	humores
60	6	repullalação	repullulação
71	9	BERING	BEHRING
94	21	poteica	proteica
106	29	sulphato	sulfato
130	16	dessecação	dessecação
139	30	especificidade	especificidade
142	25	elle	elles
152	9	dessecação	dessecação
165	18	NUTTAL	NUTTALL
»	21	BERING	BEHRING











S
E
C
R
E
T

Sala
Gab.
Est.
Tab.
N.º

1977

W. CAMPOS -- DISSERVAÇÃO INAUGURAL -- MEDICINA

1977