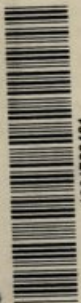


Sala 5  
Gab. —  
Est. 56  
Tab. 7  
N.º 47



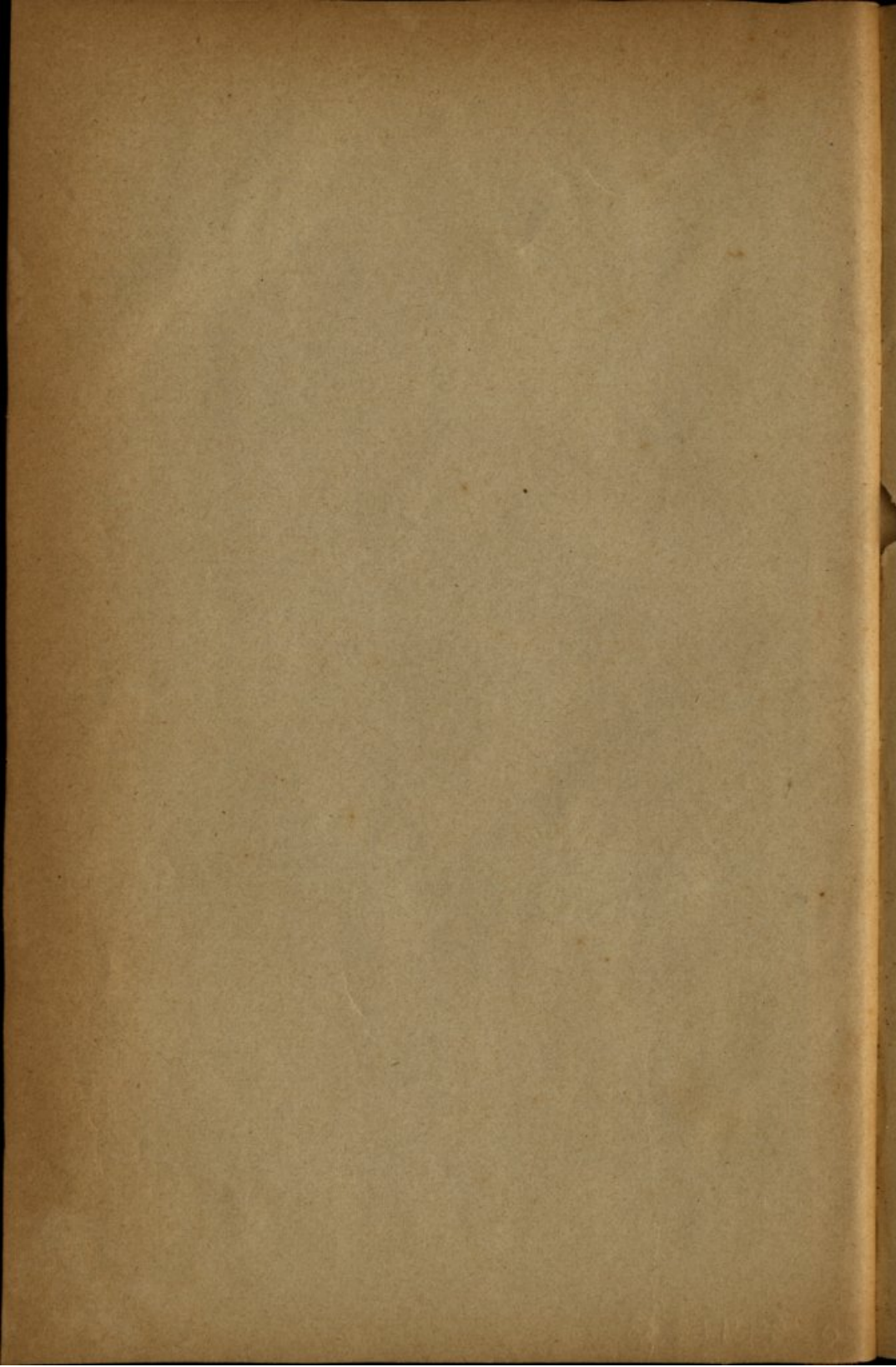
UNIVERSIDADE DE COIMBRA  
Biblioteca Geral




1301500421



624497733





AS NUCLEINAS

E

AS PROPRIEDADES BACTERICIDAS DO SÔRO



A. V. CAMPOS DE CARVALHO

---

# AS NUCLEINAS

E

AS PROPRIEDADES BACTERICIDAS DO SÔRO



COIMBRA

TYPOGRAPHIA FRANÇA AMADO

—  
1897

AS NUCLÉINAS

AS PROPRIEDADES REACTIVAS DO BORO

DE MEDICINA



COLEÇÃO

DE LIVROS DE MEDICINA



DISSERTAÇÃO INAUGURAL

PARA O

ACTO DE CONCLUSÕES MAGNAS

NA

FACULDADE DE MEDICINA

DA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DISSERTAÇÃO

DE

FACULDADE DE MEDICINA

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

A minha mulher

A. M. S. 1848

# INTRODUCCÃO

## I

Depois que a bacteriologia mostrou que as doenças infectuosas eram causadas por microorganismos, concentraram-se os esforços da therapeutica na descoberta dos agentes mais convenientes para destruil-os, tornal-os inoffensivos ou, pelo menos, para attenuar a sua virulencia.

Fóra da economia animal, a destruição das bacterias affigurava-se facil e segura porque podiam pôr-se em acção os meios mais energicos, mais violentos; mas, no organismo, especialmente quando os germens se achassem disseminados pelos tecidos, o problema era muito mais delicado, pois havia necessidade de empregar substancias antisepticas que, em dose activa para as bacterias, não compromettessem a vitalidade dos elementos anatomicos.

Com as reservas que esta consideração impunha, iniciou-se a lueta directa contra os microbios pathogeneos e as victorias logo ganhas no terreno

da cirurgia, da hygiene, da obstetricia, da dermatologia e d'outros ramos das sciencias medicas, têm-se succedido até hoje, de cada vez mais completas e decisivas.

A cirurgia, que atravessava um periodo de recordações terriveis, em que as complicações septicas constituíam a função quasi obrigada da intervenção operatoria, graças á antiseptia e á asepsia, viu surgir uma nova era de triumphos tam brilhantes que o seu campo d'acção, enormemente dilatado, avassalou por um momento os dominios da therapeutica interna.

O que valia a cirurgia da epocha pre-antiseptica, bem póde julgar-se por estas palavras de TRELAT: «As mais pequenas operações, a cataracta, uma ablação de phalange, a extracção d'um kysto, a incisão d'um abcesso ou d'um panaricio, podiam ser seguidas de morte; as fracturas complicadas eram quasi sempre fataes; as feridas das serosas, synoviales articulares ou cavidades visceraes, inspiravam um tal terror que paralysava toda a acção».

A doutrina microbiana veio levantar a therapeutica cirurgica do estado lamentavel em que ella se encontrava: reformou-se radicalmente o tratamento das infecções locaes; as operações gravissimas d'outr'ora, a amputação dos membros, a ablação da mamma, as resecções articulares, entraram na pratica quotidiana sem risco para os doentes; ao abrigo dos germens do exterior, o bisturi do cirurgião aventurou-se a penetrar nas

grandes cavidades visceraes, extirpando tumores, reseccando orgãos, dando sahida a collecções purulentas; a sua mão nem se deteve perante a estructura delicada e as funcções quasi mysteriosas do systema nervoso central e lá foi obstar aos effeitos da presença, tantas vezes mortaes, de tecidos degenerados, de corpos extranhos, de fórmulas anomalas. Pena foi que por vezes a audacia, animada por tam maravilhosos resultados, levasse longe demais a intervenção sangrenta; mas, quem poderá admirar-se de que tanta luz, lançada de repente por sobre uma multidão avida de progresso, não deslumbrasse alguns dos assistentes?

A descoberta dos micro-organismos pathogeneos reflectiu-se na hygiene não menos beneficamente. D'ella nasceram os poderosos diques de defesa actualmente oppostos á diffusão das epidemias da cholera, peste e febre amarella; o estudo do *habitat* dos microbios e dos seus vehiculos de transporte, evidenciou os perigos da agua, das poeiras e dos alimentos, d'origem animal ou vegetal, suspeitos de inquinação bacteriana; dotaram-se as cidades de bons systemas de canalização d'aguas e de exgottos, fixaram-se regras para a construcção das casas de habitação e installação dos grandes estabelecimentos de trabalho e de caridade, reconheceu-se a necessidade e formularam-se os processos de desinfecção das roupas, utensilios e habitações dos doentes atacados de molestias contagiosas epidemicas, imprimiu-se, emfim, á

prophylaxia geral das infecções uma orientação racional e segura, indicando-lhe os meios de evitar ou destruir os parasitas pathogeneos.

Na prophylaxia individual, precisou-se melhor a noção do contagio, indicando a parte com que para elle concorrem a athmosphera, o solo, a agua, os moveis, os estofos, etc.; estudou-se a influencia da hereditariedade, dos climas, das altitudes, do frio, do calor, da inanição, do traumatismo, da fadiga, da viciação do ar, da intoxicação, etc., sobre a receptividade para os microbios; creou-se, em summa, um systema de preceitos preventivos que, observados rigorosamente, offerecem solidas garantias.

E que diremos dos progressos realizados pela obstetricia, devidos á antiseptia e á asepsia? A infecção puerperal, que nas maternidades melhor organizadas ceifava innumeradas vidas, furta hoje apenas uma d'entre centenas; as grandes operações d'obstetrica praticam-se a salvo das complicações que mais lhes escureciam o prognostico; recorre-se menos vezes ao sacrificio da vida do feto; n'uma palavra, a gestação, outr'ora entrecortada de incidentes septicos que a todo o momento ameaçavam a existencia da mulher, reconquistou em parte a serenidade de evolução que naturalmente lhe compete como funcção physiologica.

Em dermatologia, a medicação antiseptica occupa um lugar proeminente no tratamento de muitas affecções parasitarias, nas trichophytias, no lupus, etc.



O rapido esboço que vimos traçando não deixa subsistir, em summa, a mais pequena duvida sobre a efficacia e o alto valor da antiseptia local e da desinfecção prophylactica; uma e outra são fructos preciosos da doutrina microbiologica, consequencias quasi immediatas das primeiras descobertas no campo da bacteriologia.

Lancemos agora os olhos para a therapeutica medica e vejamos se ella tirou identico partido dos conhecimentos bacteriologicos.

A antiseptia cirurgica deu desde o principio as provas de suas virtudes: destruindo os germens nocivos, a doença curava; como não havia de pensar-se, pois, em combater as infecções generalizadas ou, embora limitadas, inacessiveis aos meios cirurgicos, pela antiseptia interna, geral?

Mas, a introduccão na economia d'uma substancia antiseptica, em quantidade sufficiente para levar a morte aos microbios espalhados pelos tecidos, não offenderá egualmente as cellulas do organismo?

Desde as primeiras tentativas de antiseptia geral, levantou-se contra sua exequibilidade a seguinte objecção: os agentes capazes de destruir as cellulas dos parasitas vegetaes, muito resistentes, não pouparão, com maioria de motivos, os elementos anatomicos, altamente delicados, dos tecidos animaes.

Este argumento, que *a priori* poderia considerar-se temerario, infelizmente possui já agora o valor que lhe têm conferido os innumerados ensaios,

pouco animadores, de antisepsia geral no tratamento das doenças infectuosas.

Não ha duvida de que se conhecem antisepticos que em doses por assim dizer infinitesimas atenuam a virulencia, deprimem a vitalidade e impressionam mesmo mortalmente as bacterias; é certo que o *equivalente toxico* d'alguns, (naphtolz, mistura de diversas essencias, etc.) é superior ao seu *equivalente antiseptico* (BOUCHARD); mas, o que valem todas estas investigações, tam engenhosamente conduzidas e na apparencia tam esperançosas, perante os desenganos da observação clinica?

A malaria, a syphilis e o rheumatismo articular agudo apontam-se como doenças, seguramente de natureza infectuosa, que de ha muito possuem um tratamento *especifico*; entretanto, accentue-se bem, não foram as ideias de antisepsia nem as indicações da experimentação bacteriologica que presidiram á applicação da quinina, do mercurio e do acido salicylico nas referidas doenças. Por outro lado, o supposto hematozoario da malaria não entra na classe das bacterias quando são estas, evidentemente, que desempenham o papel mais importante na etiologia geral das infecções; os agentes etiologicos da syphilis e do rheumatismo articular agudo, se bem que de natureza viva, como tudo leva a crer, não foram ainda descobertos, podendo igualmente distanciar-se muito das bacterias; por ultimo, está longe de ser demonstrado que o mercurio, o acido salicylico e a quinina actuem dire-

ctamente como antisepticos sobre os agentes especificos da syphilis, do rheumatismo agudo e da malaria. Admittindo, porém, que esta triade de *especificos* se dirige immediatamente ás causas da doença, teremos de reconhecer, com pesar, que os seus effeitos therapeuticos nem sempre se manifestam com aquellâ promptidão e segurança que acompanham geralmente a antiseptia cirurgica.

Os resultados do tratamento da tuberculose pela creosota e seus derivados tambem não poderão inculir-nos grandes enthusiasmos pela antiseptia geral; nas demais doenças infectuosas — e constituem ellas uma maioria esmagadora! — este methodo therapeutico tem-se mostrado completamente inefficaz.

Deveremos pois renunciar á aspiração de combater as infecções pela antiseptia geral?

E' a antiseptia geral «uma chimera, um sonho, uma illusão generosa» que da mente devamos affastar?

Não subscrevemos de nenhuma maneira para esta opinião. Se indicámos a insufficiencia actual da antiseptia *medica* e as decepções que nos tem proporcionado e, pelo contrario, puzemos em relevo os enormes beneficios colhidos da antiseptia *cirurgica e prophylactica*, foi sómente para d'este contraste fazer resaltar que a primeira, para adquirir a segurança e a generalidade de applicação da segunda, requer novos processos d'investigação em que se attenda ás circumstancias que concorrem na genése da doença.

As doenças infectuosas resultam do conflicto de duas energias vitaes — os micro-organismos e a economia animal — que reclamam por egual a nossa attenção.

Quando o conflicto se trava n'uma região restricta da economia, accessivel á mão do cirurgião, podemos em geral triumphar das bacterias, empregando quaesquer substancias que *in vitro* accusem propriedades microbicidas energicas; evitando a absorpção do antiseptico, embora actuemos indistinctamente sobre as cellulas animaes e vegetaes, logo que estas desapareçam, as primeiras serão regeneradas ou substituidas por outras.

Para intervir activamente nas infecções internas, inacessiveis aos meios cirurgicos, ou havemos de tomar a offensiva directa contra as bacterias, recorrendo á antisepsia geral, ou então fornecer ao organismo os materiaes proprios para augmentar a sua resistencia natural; ora, sem preencher simultaneamente estas duas grandes indicações pathogenicas — lesar o microbio e auxiliar ou, pelo menos, poupar o organismo — que a therapeutica ainda não conseguiu harmonizar, não poderemos instituir um tratamento effcaz e geral das doenças infectuosas.

Na verdade, para realizar a antisepsia geral não basta resolver a difficil questão de encontrar uma substancia poderosamente bactericida *in vitro* e ao mesmo tempo facilmente tolerada pelo organismo: é ainda absolutamente necessario que

depois d'absorvida conserve a sua energia antiseptica, se diffunda uniformemente na economia e não aniquile os elementos de defesa do animal.

Injectando soluções antisepticas nas veias ou no tecido cellular d'um animal previamente infectado, sem nunca attingir a dose minima capaz de provocar os primeiros symptomas d'intoxicação, não só a marcha da doença não se modifica favoravelmente mas, em geral, apressâmos a sua terminação fatal; este resultado é a consequencia necessaria das perturbações determinadas pelo antiseptico, da sua transformação em substancias inactivas, da diminuição do poder bactericida dos humores ou da phagocytose, etc. E, se nos animaes, que se encontram nas melhores condições para resistir á infecção, os antisepticos produzem effeitos tam nocivos, como não hão-de comprometter ainda mais gravemente o organismo d'um doente predisposto á pullulação microbiana?

As garantias que nos offerêcem os antisepticos actualmente empregados não são menos incertas attendendo á ignorancia em que estamos sobre se a sua acção no organismo, ainda quando não soffram modificações, corresponde á que manifestam nos meios ordinarios de cultura; por outra parte, admittindo que se distribuem uniformemente nos liquidos da economia, as bacterias continuarão a vegetar no interior das cellulas, onde sabemos que se encontram com frequencia e ahi podem persistir vivas durante muito tempo.

«Pretender jugular a doença parasitaria, diz

SERWITZ, saturando systematicamente o organismo de substancias nocivas aos microbios, sem olhar ás condições dos elementos que entram em lucta, não nos parece mais logico nem menos arriscado do que, para soccorrer uma cidade invadida pelo inimigo, lançar por sobre ella um chuveiro de metralha, na presumpção irrisoria de que só os invasores offerecerão o peito aos estilhaços».

Estas ligeiras considerações explicam os insuccessos dos investigadores, aliás muito habéis, que tendo reconhecido em algumas substancias um equivalente antiseptico inferior ao seu equivalente toxico, julgaram-se momentaneamente na posse do tratamento radicalmente curativo d'um grande numero, senão de todas as doenças microbianas; assim como demonstram que a experimentação, para nos levar certamente á descoberta dos processos efficazes de antiseptia geral, tem de vazar-se n'outros moldes mais conformes com a pathogenia das infecções.

A antiseptia geral não tendo dado resultados satisfactorios vejamos se, abstrahindo do mechanismo por que se produzem as doenças microbianas, a medicina conseguiu por outras vias prevenil-as ou combatel-as mais proficuamente.

E' um facto da observação clinica, registado desde tempos immemoriaes, que a variola, a syphilis e outras doenças, depois d'um primeiro

ataque, conferem uma certa immuidade para as mesmas affecções. Impressionados por esta circumstancia, os antigos trataram de prevenir o desenvolvimento das fórmas graves da variola, provocando artificialmente outras mais benignas; crearam assim o methodo das vaccinas (1).

A variolização prophylactica, conhecida e praticada pelos Chinezes, Persas e Arabes desde remotas eras, foi introduzida na Europa no principio do seculo 18.º; a guerra que lhe moveram a Faculdade de medicina de Paris e outras corporações, scientificas e religiosas, impediram em certa medida que ella se generalizasse até que JENNER, com a sua admiravel descoberta, veio desthronal-a completamente.

De JENNER ao periodo bacteriologico, a vaccinação pelos virus restou limitada á variola e ainda á peripneumonia epizootica; depois, os processos de attenuação da virulencia das bacterias pelo calor, desecção, antisepticos, envelhecimento das culturas, etc., e a determinação da influencia da quantidade de virus e da sua porta d'entrada no organismo sobre a fórma e a gravidade das infecções, permittiram alargar bastante a sua applicação, mas só aos animaes.

No homem, ao contrario do que se podia esperar das incessantes indicações fornecidas pela

(1) Alguns auctores pretendem distinguir a vaccinação pelas vaccinas vivas da vaccinação pelos virus attenuados; esta distincção, ainda que não fosse injustificavel, não teria importancia real,

pathologia experimental, a vacinação pelas vacinas vivas não logrou conquistar uma posição saliente na prophylaxia geral das doenças infecciosas.

Possuíamos a preciosa vaccina com que ha um seculo JENNER libertara a humanidade d'um dos maiores flagellos que a têm assediado; passados 90 annos, o genio inspirado de PASTEUR dava-nos a conhecer a vaccina anti-rabica que, se menos valiosa do que a de JENNER, conta já no seu activo algumas centenas de vidas arrancadas aos horrores da hydrophobia; depois da descoberta de PASTEUR, não faltaram investigadores illustres que tentassem a vacinação pelos microbios attenuados mas, até hoje, forçoso é confessal-o, o terreno tem-se mostrado muito ingrato.

D'entre essas numerosas tentativas, algumas ha que alimentam ainda as esperanças dos seus auctores: a vaccina de D. FREIRE, contra a febre amarella, apesar de insistentemente recommendada desde 1885, não tem o favor das proprias corporações scientificas do Rio de Janeiro; a de HAFFKINE, contra a cholera, ensaiada largamente na India, parece preservar um numero muito restricto dos individuos vaccinados; a de WRIGHT e SEMPLE (1), contra a febre typhoide, inspirada por

(1) Esta vaccina, na opinião de WRIGHT e SEMPLE, é constituída pelos bacillos mortos; o aquecimento das culturas a 60° durante poucos minutos não garante, porém, a destruição dos bacillos, como os auctores observaram em alguns casos.



HAFFKINE, é muito recente para se poder julgar do seu valor mas, na hypothese mais favoravel, a sua esphera d'applicação será muito limitada, como os proprios auctores reconhecem; etc.

Como acabâmos de verificar, da mesma maneira que não temos colhidô beneficios reaes da antiseptia geral, tambem não havemos tirado das vaccinas vivas resultados animadores; para o futuro, porém, a antiseptia, mudando de objectivo, isto é, combatendo as bacterias pelo reforço levado ao organismo, poderá assumir uma preponderancia unica no tratamento das doenças virulentas ao passo que a vaccinação não ganhará decerto uma applicação geral na prophylaxia das infecções.

## II

Ao mesmo tempo que proseguiam os ensaios de antiseptia geral e de prophylaxia pelas vaccinas vivas, outros trabalhos, n'um campo differente, prendiam com equal interesse a attenção dos bacteriologistas.

Comprehendeu-se desde ha muito que para dar batalha ás bacterias virulentas, era de toda a vantagem, senão de necessidade, conhecer as armas com que ellas nos atacavam, os processos por que lesavam os tecidos e perturbavam tam

profundamente o funcionamento dos órgãos, em summa, o mechanismo que presidia a sua funcção pathogenea; esclarecidos estes phenomenos que, em verdade, constituíam a parte da pathogenia mais ligada aos microbios, previa-se que na impossibilidade de vencel-os directamente, espalhando a morte pelas suas fileiras, poderíamos tornal-os inoffensivos, neutralizando os effeitos nocivos dos seus meios d'acção.

Estas previsões não foram desmentidas: a vaccinação chimica e, a sôrotherapia antitoxinica, que tanto enthusiasmo tem despertado, derivaram dos estudos orientados n'aquelle sentido.

Como é, pois, que as bacterias produzem a doença?

A primeira ideia que naturalmente assaltou o espirito dos pathologistas foi a da concorrência vital. Suppoz-se que as bacterias, vivendo como parasitas na intimidade dos tecidos, subtrahiam aos succos nutritivos as substancias necessarias para a reparação dos elementos anatomicos. Esta hypothese não se compadecia com a evolução fulminante d'algumas doenças infectuosas, nem com a localização, inteiramente superficial, dos microbios n'outras e, muito menos, com o quadro symptomatico da inanição.

BOLLINGER, desde 1872, recorreu egualmente á concorrência vital, mas restricta ao consumo do oxygenio, para explicar as desordens produzidas pelo *bacillus anthracis*. Os symptomas asphyxicos, muito accentuados, d'algumas fórmulas de carbun-

culo; as alterações observadas na autopsia, semelhantes ás da morte por asphyxia; a existencia de numerosos bacillos no sangue durante a vida e a vegetação aerobea d'estes, pareciam indicar realmente que se tratava d'uma subtracção d'oxygenio dos globulos rubros determinada pela bacteridea; mais tarde, PASTEUR, verificando que as aves resistiam ao carbunculo, contribuiu para sustentar aquella opinião, alvitando que n'estes animaes as hematias não cedem facilmente o oxygenio ligado á hemoglobina.

E' evidente que a explicação de BOLLINGER apenas podia aproveitar ás doenças microbianas que reunissem um conjuncto de condições analogas ás do carbunculo; mas, mesmo para o carbunculo, NOVOS factos vieram em breve demonstrar a falsidade da theoria asphyxica. VIRCHOW, SIEDAMGROTZKY, JOFFROY e o proprio BOLLINGER reconheceram que a bacteridea raras vezes se encontra no sangue na enorme proporção a principio computada por DAVAINE; OEMLER observou que o sangue, embora contenha muitos bacillos, apresenta a côr rutilante da oxyhemoglobina; TOEPER e ROLOFF referiram casos de carbunculo apoplectiforme sem que se manifestassem symptomas de asphyxia; TOUSSAINT notou que nos animaes inoculados com o *bacillus anthracis*, respirando uma atmospheria muito rica em oxygenio, a evolução da doença não se modificava; emfim, NENCKI verificou que a intensidade de oxydação de certos medicamentos era identica

nos animaes saudaveis e nos inoculados com o carbunculo.

O estudo das lesões provocadas pela bacteridea forneceu ainda a BOLLINGER elementos para edificar a sua theoria da interferencia mechanica pelas embolias bacillares.

Observando o córte d'um rim, convenientemente corado, d'um porquinho da India inoculado com o *bacillus anthracis*, encontram-se algumas vezes grandes massas de bacillos dilatando os capillares e os pequenos vasos sanguineos, obstando, assim, á circulação no orgão e ao seu funcionamento regular; deparam-se-nos phenomenos identicos, ainda que com menos frequencia e mais attenuados, no figado, no baço e nos pulmões.

KLEBS e TOUSSAINT defenderam vivamente a theoria das embolias; as investigações de HOFFA, VIRCHOW, etc., vieram, porém, demonstrar que os factos observados por BOLLINGER eram muito pouco constantes para appoiarem a sua opinião. Abandonada para o carbunculo, a theoria das embolias muito menos podia subsistir para outra qualquer doença.

Os pathologistas attribuiram ainda as desordens anatomicas e funcçionaes observadas nas infecções á acção traumatica das bacterias sobre os elementos cellulares, á sua deposição nos ninhos valvulares das veias, á formação de thromboses e d'embolias pela coagulação da fibrina, etc., etc.

As theorias precedentes, podendo explicar alguns dos phenomenos morbidos determinados pelos

microbios, não satisfaziam, porêm, á generalidade do quadro *anatomo-physiologico* da pathologia das infecções: concediam aos pequenos obreiros da doença instrumentos muito simples para realizarem um trabalho em extremo complexo e, por vezes, com extraordinaria presteza; ellas cahiriam de pressa, sem recorrer a mais do que a uma analyse dos symptomas, se outra theoria, já de longa data esboçada, não viesse descobrir nas bacterias armas mais traiçoeriras.

Os primeiros delineamentos da theoria da intoxicação nas doenças microbianas foram traçados muito antes da descoberta das bacterias pathogeneas.

Em 1822, GASPARD e STICK, consideraram, como de natureza toxica, os effeitos das injeções nos animaes dos productos da carne em putrefacção. BOYER (1834), BONNET (1837), GUETERBROCK (1838), DUMAS (1841), WEBER (1864), attribuiram as complicações septicemicas das feridas ao desenvolvimento *in loco* e absorpção consecutiva de diversas substancias toxicas.

PANUM, em 1855, julgou ter demonstrado que a causa dos accidentes septicemicos era realmente um veneno chimico e não um *virus* ou *miasma*, verificando que o calor a 100° não modificava as propriedades nocivas dos productos da putrefacção.

Depois das investigações de PANUM, algumas Universidades allemãs puzeram a concurso o estudo da causa da infecção putrida; appareceram então

as memorias de HEMMER, SCHWENINGER, MÜLLER, BERGMANN e SCHMIEDEBERG, etc., que confirmaram a opinião de PANUM relativa á natureza chimica do *veneno putrido*.

Em 1872, A. GAUTIER reconheceu, d'uma maneira definitiva, a existencia de alcaloides venenosos derivados da fermentação bacteriana; e SELMI, de 1870 a 1874, nos seus notaveis trabalhos sobre os alcaloides cadavericos, demonstrou que, durante a putrefacção, produzem-se verdadeiros alcaloides organicos toxicos, analogos aos alcaloides vegetaes.

A estas descobertas de GAUTIER e SELMI succederam-se outras dos mesmos auctores e de NENCKI, BROUARDEL e BOUTMY, POUCHET, BRIEGER, etc., que puzeram em evidencia grande numero de *ptomainas* toxicas, produzidas tanto pelos microbios da putrefacção, alguns dos quaes são pathogeneos, como pelas bacterias mais communs das doenças infectuosas.

Ao lado, porém, das ptomainas, os microbios pathogeneos fabricam substancias muito toxicas, de constituição albuminoide (segundo geralmente se admite), mais ou menos diffusiveis nos liquidos de cultura, a que principalmente devem as suas qualidades virulentas.

Desde 1876, HILLER verificou que as materias putridas, filtradas, conservam a sua toxidez; a experiencia repetida por ANDERS em 1877 indicou, todavia, que o liquido de filtração era menos activo do que a substancia primitiva.

TOUSSAINT, em 1878, e CHAUVEAU, em 1879, emitiram a hypothese de que a bacteridea segrega um veneno soluvel, capaz de provocar as perturbações observadas no carbunculo; e PASTEUR, em 1880, mostrou que o extracto de culturas filtradas do bacillo da cholera das gallinhas, injectado nos animaes, produz uma somnolencia que recorda de perto a dos animaes inoculados com o proprio virus.

Em 1887, CHARRIN provou d'uma maneira irrefutavel que as culturas do bacillo pyocyanico, previamente filtradas ou esterilizadas pelo calor, quando injectadas no coelho, determinam «todas as perturbações que se observam quando se inocula com prudencia e directamente o proprio virus rico em bacillos vivos»; BOUCHARD, completou a demonstração de que a doença pyocyanica é produzida por um veneno segregado pelo bacillo e circulante nos tecidos, mostrando que as urinas do animal doente, depois de esterilizadas, reproduzem nos animaes em que se injectam o quadro symptomatico caracteristico d'aquella affecção.

Para o bacillo do pus azul não restava, portanto, a menor duvida de que era á substancia soluvel por elle formada, tanto nas culturas *in vitro* como no organismo, que se deviam imputar as principaes alterações observadas na doença pyocyanica; conhecido este facto, não tardou que novos trabalhos viessem revelar a existencia d'outras *toxinas*, produzidas pelos microbios do carbunculo, da gangrena gazosa, da febre typhoide, da diphteria, do tetano, etc.

Os microbios devem, pois, quasi por completo a sua funcção pathogenea, isto é, a sua virulencia, ás substancias eminentemente toxicas que fabricam; n'alguns, como o bacillo de KLEBS-LÆFFLER e o de NICOLAÏER, estes venenos diffundem-se rapidamente nos liquidos de cultura, de maneira que a sua penetração na corrente circulatoria realiza-se independentemente da do microbio; n'outros, como o bacillo da tuberculose, a substancia toxica encontra-se principalmente no corpo da bacteria.

Depois de se reconhecer que as bacterias actuam pelas substancias toxicas que segregam, occorreu naturalmente a idéa de substituir na vaccinação os virus mais ou menos attenuados mas vivos, pelas culturas esterilizadas ou simplesmente privadas dos germens por filtração.

Por este processo de vaccinação, geralmente denominada « vaccinação chimica », CHARRIN (1886), ROUX e CHAMBERLAND (1887), GAMALEIA (1888), CHANTEMESSE (1888), etc., tornaram refractarios alguns animaes respectivamente contra a doença pyocyanica, a septicemia do vibrião septico, a peritonite cholericica, a febre typoide, etc.; no homem, a vaccinação chimica, raramente tentada, não se affirmou até hoje por resultados dignos de menção.

Da vaccinação chimica nasceu a sôrotherapia antitoxinica.



BEHRING e VERNICK, em 1889, vaccináram alguns animaes contra o tetano empregando a cultura filtrada do bacillo de NICOLAÏER ou o proprio virus misturados com tri-chloreto de iodo; e, em 1890, BEHRING e KITASATO descobriram que o sôro de coelhos assim vaccinados possuia propriedades immunisantes e antitoxicas energicas contra o bacillo e o veneno tetanicos. Juntando o sôro de animal vaccinado ao bacillo ou ao veneno tetanico, a injecção da mistura em animaes muito sensiveis ao tetano não determina phenomenos de intoxicacão e os bacillos tornam-se inoffensivos; da mesma maneira, a inoculação da toxina ou da cultura tetanica não determina effeitos toxicos se o animal receber previamente uma injecção de sôro antitetanico.

BEHRING obteve resultados identicos na diphteria: o sôro de animaes immunisados, neutralizava a toxidez dos productos soluveis do bacillo de KLEBS-LËFFLER, assim como obstava ás alteraçoes por este produzidas no organismo.

As descobertas fundamentaes de BEHRING não podiam deixar de ter uma applicação immediata na clinica, tanto mais que se referiam a duas doenças que realizam o verdadeiro typo da intoxicacão microbiana; ora, a virtude therapeutica do sôro mais em evidencia era precisamente a de neutralizar as toxinas. E, na verdade, dentro de pouco tempo, iniciava KITASATO o tratamento do tetano e BEHRING, BOER, KOSSEL, etc., o da diphteria pelos sôros antitoxicos.

O sôro de animaes vaccinnados e immunisados por differentes processos, bem como o de animaes naturalmente refractarios, tem sido experimentado no tratamento de muitas doencas infectuosas; d'essas tentativas, interessantes sob outros pontos de vista, apenas reclamam por agora a nossa attenção aquellas que passaram a applicar-se correntemente na clinica.

Analysemos muito summariamente o valor therapeuticos dos sôros actualmente empregados.

Na intoxicacão microbiana mais nitida — o tetano — a sôrotherapia não nos assegurou os beneficios que promettia: quando a toxina é absorvida de repente e em grande quantidade, isto é, nas fórmas agudas da doença, o sôro antitoxico, embora neutralize o veneno accumulado no organismo, não poderá evitar as consequencias fataes das alteraçoes nervosas já consummadas; nas fórmas chronicas, em que a toxina impregna lentamente a economia, contra o que podia esperar-se, as observaçoens publicadas não são mais favoraveis ao sôro que aos antigos meios therapeuticos.

A sôrotherapia deu melhores resultados na diphteria. E' hoje universalmente admittido que a applicação do sôro antidiphterico fez baixar consideravelmente a mortalidade da doença; a superioridade do tratamento accentua-se sobremaneira nas infecções simples pelo bacillo de KLEBS-LÆFFLER, quando a intervençao é precoce.

O poder prophylactico do sôro tambem não pôde contestar-se; entretanto, os accidentes graves que

por vezes determina e a pequena duração da immuidade, recommendam a mais severa prudencia no seu emprego.

A utilidade dos sôros antistreptococcicos é mais que duvidosa: na septicemia puerperal, imputam-se-lhe casos fataes (BAR, GAULARD, etc.) e poucos ou nenhuns effeitos therapeuticos; na erysipela, a propria estatistica de CHANTEMESSE não convence das suas vantagens sobre o tratamento mais simples de JUHEL-RÉNOY; nas septicemias cirurgicas, phlegmões, etc., faltam observações em numero sufficiente mas, a julgar pelas poucas conhecidas, os resultados não parecem mais felizes. Trabalhos muito auctorizados levam a crer que alguns sôros antistreptococcicos (como, por ex., o de MARMOREK) são applicaveis apenas ás infecções de laboratorio, produzidas pela variedade streptococcica com que previamente se immunisaram os animaes.

Dos sôros antituberculosos sómente o de MARAGLIANO conseguiu uma certa reputação entre alguns clinicos italianos; apesar da estatistica do auctor comprehender numerosos casos, a utilidade d'aquelle agente therapeutico não poderá aquilatar-se sem mais elementos elucidativos.

Não nos deteremos na apreciação da sôrotherapia da pneumonia, peste bubonica, cholera, febre typhoide, staphylococcia, lepra, etc., porque d'esses ensaios, uns já foram repudiados pela clinica e outros esperam novas investigações que decidam do seu valor.

Temos, em summa, uma doença infectuosa —

a diptheria — que a sôrotherapia combate com vantagem; nas restantes doenças virulentas, a sôrotherapia fará alguns progressos, sem duvida, mas por emquanto não merece grande confiança.

Depois de seis annos de investigações incessantes sobre a sôrotherapia das infecções, realizadas pelos bacteriologistas mais competentes e com a actividade febril propria do nosso tempo, é necessario concordar em que as victorias por ella alcançadas contra os microbiós pathogeneos não corresponderam nem á espectativa dos menos exigentes.

A que attribuir, pois, este insuccesso relativo da therapeutica dos sôros? Como explicar a enorme differença entre os effeitos muito apreciaveis da sôrotherapia nas infecções experimentaes e a sua insufficiencia na pathologia humana?

O insuccesso clinico da sôrotherapia reconhece por causa não só os defeitos inherentes ao methodo como outros que, sendo-lhe extranhos, poderão remover-se para o futuro.

N'algumas doenças, como o tetano, o sôro dos animaes immunisados daria resultados maravilhosos se, empregado em quantidade conveniente, a sua applicação precedesse o desenvolvimento das alterações anatomicas de elementos essenciaes á vida; emquanto não se descobrir o meio de reparar taes alterações e o diagnostico continuar a affirmar-se tardiamente, é evidente que nem da sôrotherapia nem de qualquer outra medicação poderemos colher melhores fructos.

A maior parte das doenças virulentas evoluçio-

nam sob o impulso d'algumas bacterias pathogeneas; as lesões primitivas, na verdade, podem ser provocadas por um só agente especifico mas, mais tarde, no terreno assim preparado, implantam-se novas especies que vegetam ao lado da primeira; d'esta associação microbiana, partem em todos os sentidos venenos diferentes que se contrariam, modificam ou ampliam nos seus effeitos. As reacções cellulares, determinadas por este conjunto de factores, são muito complexas para que a clinica possa caracterizal-os. N'estas circumstancias, a sôrotherapia dirige-se contra o elemento que se reputa especifico ou mais nocivo; os agentes da infecção secundaria continuam, porém, a pulular livremente e, quando não obstem á acção directa ou indirecta do sôro sobre o microbio visado, favorecem pelo menos o seu desenvolvimento ulterior.

Outras doenças, como as septicemias, são provocadas por microbios de especies diferentes; havendo recursos materiaes para o diagnostico, a escolha do sôro apropriado não offerece difficuldade; mas, ainda n'esta hypothese, a investigação diagnostica, alem de delicada, requer por vezes tempo bastante para que a infecção progrida a ponto das lesões organicas se tornarem irreparaveis.

Quando o agente etiologico comprehende muitas especies ou variedades, se o sôro do animal immunizado contra uma não for activo para as restantes, para não nos sujeitarmos ás contingencias do acaso, teremos de renunciar frequentemente á sua

aplicação. Nas infecções de streptococcus, por ex., em que KLEIN (1896) descreve nove variedades ou espécies de coccus em cadeia, o sôro animal immunisado contra o *streptococcus erysipelatosus* de FEHLEISEN actuará sempre com identica energia contra todas as restantes?

Um dos principaes inconvenientes da sôrotherapia, que imprime ao methodo um caracter de transição, resulta de nos sôros existirem principios toxicos ao lado das antitoxinas e das substancias propriamente bactericidas; o inconveniente é tanto maior quanto a toxidez do liquido, variando por uma fórma extraordinaria segundo o animal de que provém e o individuo em que se injecta, não póde dosar-se nem ainda uniformizar-se. Os accidentes graves e por vezes fulminantes produzidos pelos sôros, a sua facil alteração, sem que o clinico tenha meios de reconhecê-la, a variabilidade do seu poder immunisante, a necessidade de injectar grandes porções, etc., constituem outras tantas razões de inferioridade do methodo.

### III

Acabámos de verificar que a antiseptia geral, visando exclusivamente as bacterias, era impotente para dominar as infecções; vimos que as vaccinas

não parecem susceptíveis d'uma applicação geral na prophylaxia das doenças microbianas; a sôrotherapia, que se afigurava tam vantajosa após as descobertas de BEHRING, representa um systema de transição, deficiente e arriscado, que desaparecerá no dia em que se definirem os principios activos dos sôros.

Os rapidos progressos da bacteriologia nos ultimos annos, esclarecendo por uma fórmula notavel o mechanismo que preside ao desenvolvimento das infecções, dão-nos a garantia de que em breve estes methodos therapeuticos serão substituidos por um tratamento racional e verdadeiramente pathogenico.

Antes da era microbiana, no periodo da therapeutica symptomatica e physiologica, os agentes de que conscientemente podiamos lançar mão para combater as infecções, apenas incidiam sobre um dos factores da doença — o suporte organico; comprehende-se que, em taes circumstancias, a defesa do organismo (se defesa lhe podemos chamar!) havia forçosamente de ser frouxa, incompleta, desordenada, tumultuosa e não raro contraproducente. O entusiasmo despertado pelos primeiros clarões que illuminaram a natureza dos virus, lançou a therapeutica n'uma direcção opposta, fazendo-lhe esquecer por momentos que o terreno em que germinavam os microbios representava na doença um papel tão importante como o inimigo que o invadia.

Do encontro das duas correntes, a que se dirigia

ao suporte organico e a que affrontava exclusivamente a causa exterior, derivará a resultante pathogenica: á antiseptia, que visava acima de tudo as bacterias, succedeu a sôrotherapia que já attende aos dois factores da doença; da sôrotherapia, dando mais um passo, chegaremos, talvez directamente, a um tratamento simples, efficaç e systematico de todas as infecções microbianas internas.

Mas como avançar mais este passo?

O caminho parece estar claramente esboçado. Se a immundade natural, adquirida ou artificial e a resistencia á infecção, constante em todos os animaes, derivarem de acções cellulares, do englobamento e digestão dos microbios pelos phagocytos, como se admite na theoria primeiro formulada por METCHNIKOFF, o *desideratum* da therapeutica, preventiva e curativa, será encontrar agentes que excitem e augmentem d'um modo permanente a actividade dos elementos phagocytarios; se, pelo contrario, como sustentam muitos auctores, a defesa do organismo está confiada principalmente ás substancias bactericidas, d'origem cellular, dissolvidas nos liquidos da economia, e o phagocytismo intervem apenas perante as bacterias como perante as particulas extranhas inertes, então o objectivo de todos os esforços consistirá em isolar dos animaes essas substancias antisepticas e applical-as ao tratamento das infecções do homem.

O futuro decidirá definitivamente da importancia



relativa d'estes dois meios geraes de defesa do organismo—o phagocytismo e o estado bactericida dos humores; entretanto, como demonstraremos, os factos conhecidos permitem desde já affirmar que ambos os processos concorrem realmente para a protecção da economia animal. E' isto quanto nos basta para abrir á investigação therapeutica uma nova via, seguros de que, se chegarmos ao seu termo, os resultados corresponderão necessariamente á nossa expectativa: existindo nos liquidos da economia substancias bactericidas, que naturalmente a defendem das bacterias, é evidente que, conseguindo isolal-as, ficaremos de posse d'um antisepticô com que poderemos realizar a antiseptia geral sem receio de produzir uma intoxicação ou de lesar os elementos anatomicos. A' antiseptia, n'esta hypothese, caberá justamente a designação de «*antiseptia natural*».

Não são, porêem, sómente as theorias humoraes da resistencia á infecção que impõem a necessidade inadiavel de proceder ao estudo das substancias bactericidas da economia: nas theorias cellulares admitte-se egualmente que os phagocytos devem áquellas substancias, pelo menos em grande parte, o seu poder sobre os microbios; portanto, o tratamento das doenças microbianas, orientado por esta fórmula, tem o privilegio de harmonizar as indicações emanadas de todas as theorias, circumstancia que mais nos garante o seu exito.

Em summa, no dia em que se conhecerem as

substancias bactericidas dos humores animaes, ficarão preenchidas as duas grandes indicações da therapeutica interna das infecções microbianas: destruir o microbio e auxiliar ao mesmo tempo o organismo.

A importancia do assumpto de que nos vamos occupar, resalta á evidencia das linhas que precedem, como se deduz da propria epigraphe d'este pequeno trabalho; a ordem por que o estudámos tambem, segundo cremos, não carece de justificação.

Se o tempo de que dispunhamos o permittisse, modificariamos a technica de immunisação e tratamento dos animaes e de certo, d'esta maneira, novas tentativas seriam melhor succedidas; assim, a benevolencia do leitor terá de desculpar não só algumas faltas que derivam das urgencias da occasião como muitas que são filhas da nossa diminuta competencia.

PRIMEIRA PARTE

PRIMEIRA PARTE

# PRIMEIRA PARTE

## I

### Propriedades bactericidas do sôro e dos humores do organismo

N'uma revista critica d'um trabalho muito notavel sobre as propriedades bactericidas do sangue, DUCLAUX exprime-se assim: « . . . acreditamos que BUCHNER tem razão em considerar a acção destruidora do sangue sobre as bacterias *como um dos factos mais geraes e mais fundamentaes da historia das infecções* ».

Estas palavras, escriptas pelo sabio director do instituto scientifico que mais tem contribuido para sustentar a theoria phagocytaria de METCHNIKOFF, se attestam a independencia do verdadeiro homem de sciencia que acima de tudo, acima do partidatismo de escola ou de nação, colloca a imparcialidade do seu juizo e a rectidão da sua consciencia, constituem, ao mesmo tempo, uma affirmação de um valor incalculavel a oppor ás tendencias obstinadas d'alguns adeptos do cellulismo puro na reacção do organismo contra as bacterias.

Da existencia ou da ausencia de propriedades microbicidas nos humores do organismo depende a ruina ou a victoria das theorias que ha muito disputam o terreno para explicar os principaes phenomenos da immuidade e da infecção; é esta, pois, uma questão fundamental, discutida vivamente e tratada com proficiencia no campo experimental pelos bacteriologistas mais auctorizados; é um problema que nos desperta ainda maior interesse por nos parecer que a sua solução conduzirá mais tarde a um tratamento verdadeiramente radical de todas as infecções internas.

Os documentos elucidativos d'este capitulo da pathologia geral são tam numerosos e extensos que só reduzindo-os aos limites laconicos das « conclusões » poderemos dar uma idéa succinta dos que reputamos mais importantes.

A LEWIS e CUNNINGHAM deve-se um dos primeiros trabalhos sobre a hostilidade do meio sanguineo para as bacterias. Observaram estes auctores (1872) que o sangue dos animaes, algum tempo depois de lhes injectar nos vasos grande quantidade de microbios, podia apresentar-se completamente privado de germens. De 12 animaes inoculados, depois de 6 horas, só o sangue de 7 continha bacterias; passadas 24 horas, de 30 animaes em experiencia, encontraram-se microbios no sangue de 14; no fim de 2 a 7 dias,

de 17 animaes infectados existiam bacterias apenas no sangue de 2.

As experiencias de TRAUBE e GSCHIEDLEN (1874) têm uma significação identica. Injectando na jugular do coelho liquidos carregados de bacterias da putrefacção, estes investigadores verificaram que o sangue do animal, extrahido da carotida 48 horas depois e recolhido asepticamente, conservava-se durante mezes sem entrar em decomposição. TRAUBE e GSCHIEDLEN attribuiram ao oxygenio ozonizado a acção antiputrida do sangue.

As experiencias de FODOR e WYSSOKOWITSCH vieram confirmar mais uma vez o desaparecimento dos germens introduzidos na corrente circulatoria; mas, em contrario da opinião dos auctores precedentes, WYSSOKOWITSCH explicava o facto não pela destruição real dos microbios no sangue mas pela sua retenção na rede capillar de certos orgãos, especialmente do figado e baço.

GROHMANN, estudando sob a direcção de A. SCHMIDT as causas da coagulação do sangue, observou que o plasma sanguineo, fóra do organismo, tambem influiu desfavoravelmente na vegetação da bacteridea. As suas experiencias mostram que o *bacillus anthracis*, ficando por algum tempo em contacto com o plasma, torna-se muito menos virulento para o coelho. GROHMANN referia d'algum modo a attenuação da bacteridea ao processo da coagulação do sangue.

FODOR, de Budapesth, n'um segundo estudo (1887) sobre o assumpto, demonstrou pela pri-

meira vez por fórma incontestavel que o sangue, mesmo *in vitro*, possui propriedades microbicidas energicas, pelo menos para a bacteridea de DAVAINE. *Um minuto* depois de injectar na jugular do coelho um c. c. de cultura carbunculosa, extrahiu do animal numerosos especimens de sangue que distribuiu por outras tantas placas de gelatina; de todas ellas só uma deu logar ao desenvolvimento d'uma colonia bacillar.

Retirando o sangue do coração do animal em condições de asepsia rigorosa, cultivando n'elle a bacteridea á temperatura de 38° e depois, com intervallos regulares e approximados, semeando-o em quantidades sempre eguaes na gelatina em placas, FODOR verificou que á medida que se prolongava o tempo de contacto do microbio com o sangue, o numero de colonias ia diminuindo successivamente até um certo limite e em seguida augmentava d'um modo progressivo. Nas placas semeadas com o sangue immediatamente depois de lhe addicionar a materia carbunculosa, desenvolviam-se numerosissimas colonias bacillares; passadas duas horas, o numero de colonias descia a um minimo que oscillava entre 300 e 8; para alem d'este periodo de tempo, o seu numero multiplicava-se com rapidez, denunciando assim que o sangue se havia transformado n'um excellente meio de cultura.

D'estas experiencias tirou FODOR argumentos para combater com vantagem a theoria da retenção capillar de WYSSOKOWITSCH; e, para harmoni-



zar o facto da susceptibilidade do coelho para a bacteridea, ainda quando ella penetra pelo apparelho vascular, com o poder germicida do sangue do animal, emittiu a hypothese de que uma pequena parte dos bacillos se refugia nos orgãos parenchymatosos e ahi se subtrae á acção destruidora do liquido hematico.

Os trabalhos de NUTTALL (1888) completam, corroboram e generalizam a outras especies de animaes e de bacterias as conclusões de FODOR relativas ao coelho e ao *bacillus anthracis*.

NUTTALL operou com o sangue do homem e de coelhos, ratos, cães, carneiros (vaccinados e não vaccinados), gallinhas, pombos, etc., e estudou a sua influencia sobre o *b. subtilis*, o *b. megaterium*, o *staphylococcus pyogenes aureus* e, especialmente, sobre a bacteridea do carbunculo. Pelo processo das «gottas pendentes» (que, como é sabido, consiste em semear as bacterias n'uma gotta de sangue ou de lymphá recolhida asepticamente do animal e conservada a uma temperatura constante e appropriada, tendo o cuidado de fazer a inoculação na periphéria da gotta para que depois da coagulação e retracção do coagulo as bacterias banhem no liquido) verificou que tanto as bacterias englobadas pelos leucocytos como as que nadavam livremente no sôro entravam simultaneamente em degenerescencia depois de pouco tempo; era de presumir, portanto, que não só os leucocytos não intervinham na producção da degenerescencia como tambem

só englobavam os microbios mortos ou degenerados.

A intensidade e a rapidez com que se produz a degenerescencia varia com o animal e com a especie de bacteria. O sangue do homem actua promptamente (em menos de duas horas) mas com pouca persistencia; com o do coelho, a degenerescencia da bacteridea termina em 5 horas e, depois de 28, desenvolve-se de novo perfeitamente; nas aves, o coagulo sanguineo é muito volumoso, o sôro transuda em pequena quantidade e, porisso, a degenerescencia limita-se a alguns bacillos; o sangue do cão comporta-se sensivelmente como o do homem, o do carneiro torna-se mais activo depois da vaccinação, etc. NUTTALL affirma que, d'uma maneira geral, a bacteridea é influenciada pelo sangue proporcionalmente ao grau de resistencia do respectivo animal para o carbunculo.

Para verificar se a degenerescencia dos microbios correspondia apenas a ligeiras modificações morphologicas ou se, pelo contrario, representava alterações profundas que interessassem e compromettessem a sua vitalidade, NUTTALL recorreu ao processo da cultura em placas, como FODOR havia já feito. Confirmou assim os resultados das experiencias d'este investigador e accrescentou mais os seguintes:

1. O sangue, alguns dias depois da sua extravasão do animal, perde as propriedades bactericidas; e,

2. a acção bactericida desaparece igualmente aquecendo o sangue á temperatura de 50° a 55°; portanto,

3. a substancia bactericida do sangue ou é muito instavel e volatil ou é de natureza diastastica.

4. Alem do sangue, outros liquidos do organismo, como o humor aquoso e a serosidade pericardica, manifestam propriedades bactericidas.

As investigações de NISSEN (1888) completaram em alguns pontos as de NUTTALL. Eis as principaes conclusões das experiencias de NISSEN:

1. O sangue do coelho e do cão mata o *coccus aquatilis* em 5 a 10 minutos; o bacillo typhico, em duas horas; o vibrião da cholera em 20 a 40 minutos.

2. O sangue do cavallo é tambem bactericida.

3. A um determinado volume de sangue corresponde um numero maximo de bacterias que podem ser destruidas completamente (cerca de 7 a 10 gottas de sangue para 50 a 100:000 bacterias); para cima d'aquelle numero, o poder bactericida restringe-se de cada vez mais.

4. As propriedades germicidas desaparecem pelo aquecimento do sangue á temperatura de 54° a 58°.

5. O sangue conserva o seu poder microbicida quando se lhe adicionam pequenas quantidades de caldo de carne aseptico ou de soluções esterilizadas de chloreto de sodio.

6. O sangue tornado incoagulavel pela injeccão previa de peptonas é igualmente bactericida.

7. Impedindo a coagulação do sangue pela adição de 25 % de sulfato de magnesio, diminue-se o seu poder bactericida.

8. A acção bactericida do sangue para as bacterias d'uma especie exgotta-se, parcial ou totalmente, injectando previamente nas veias do animal uma cultura d'aquella especie; para as outras, o poder bactericida persiste intacto.

9. Os microbios aceleram a coagulação da fibrina do sangue.

BUCHNER (1889-90) com a collaboração de VORR, SITTMAN e ORTHENBERGER, fixou d'uma maneira definitiva muitos factos interessantes relativos á acção bactericida do sôro do sangue; os seus trabalhos, acolhidos imparcialmente por uns, discutidos e contestados apaixonadamente por outros, constituíram a principal base das investigações ultteriores.

Para determinar o poder destructivo do sangue sobre as bacterias, BUCHNER modificou d'uma maneira feliz a technica adoptada por NUTTALL: emquanto que este repartia o sangue por tubos de ensaio, inoculava-os com uma especie microbiana e, depois, em intervallos variaveis, ia retirando separadamente de cada um d'elles a materia de sementeira das placas, BUCHNER procedia á inoculação n'um só tubo e d'ahi é que, em periodos

de tempo regulares, por meio d'uma ansa de platina, colhia quantidades sempre eguaes de liquido que semeava na gelatina.

As principaes conclusões do trabalho de BUCHNER são as seguintes:

1. O sangue normal e o sangue desfibrinado exercem identica influencia sobre as bacterias.

2. A temperatura de 55°, prolongada por algum tempo, supprime as propriedades bactericidas do sangue.

3. Contrariamente á opinião de NUTTALL, o sangue, conservado na geleira ou exposto á temperatura ambiente, depois de 7 e mesmo depois de 20 dias, conserva intactas as suas propriedades bactericidas; portanto,

4. os phacocytos não intervêm na acção bactericida do sangue.

5. A energia microbicida varia com a especie microbiana.

6. O sangue actua com tanta maior intensidade quanto menor é a quantidade de bacterias semeadas.

7. O sangue perde por tempo as propriedades bactericidas por causa da dissolução dos globulos rubros, a qual, cedendo alimento ás bacterias, faz com que as condições propicias á sua multiplicação predominem sobre as influencias que lhe são desfavoraveis.

8. E' ao sôro que o sangue deve as suas propriedades microbicidas.

9. O aquecimento do sôro a 55° não modifica

o seu aspecto nem altera as suas reacções químicas mas destrõe as suas propriedades bactericidas.

10. A neutralização do sôro, a expulsão do anhydrido carbonico e o tratamento pelo oxygenio não influem no seu poder microbicida.

11. As propriedades bactericidas do sôro persistem igualmente depois de acidificação ligeira pelo acido chlorhydrico e digestão consecutiva pela pepsina.

12. Submettendo o sôro recolhido em provetas a congelações e degelos successivos, as camadas superficiaes, contendo apenas 0,5 % de materias solidas, não manifestam propriedades bactericidas, emquanto que as profundas, encerrando 20,1 %, são microbicidas; portanto, a substancia microbicida de sôro, não se repartindo uniformemente no liquido, não é de natureza alcaloidica.

13. O sôro perde a actividade por dialyse na agua mas a substancia bactericida não passa para aquella; na solução physiologica de chloreto de sodio addicionada de soda bastante para lhe dar a alcalinidade do sangue, a dialyse não modifica as propriedades microbicidas do sôro.

14. Diluindo uma parte de sôro em 19 d'agua e outra parte em 19 de soluto physiologico de chloreto de sodio, a primeira solução mostra-se inactiva emquanto que a segunda é bactericida.

15. Os saes inorganicos não constituem a substancia bactericida do sôro; a perda dos saes por dialyse torna o sôro inactivo porque elles inter-

vêm na composição normal e, portanto, nas propriedades das materias albuminoides.

16. A acção bactericida do sôro é devida ás substancias albuminoides que entram na sua constituição.

A. BASTIN (1892) para evitar as causas de erro que podessem resultar das alterações soffridas pelo sangue fóra do organismo, recorreu ao processo já empregado por NISSEN e que consiste em procurar o effeito produzido sobre o poder bactericida do sangue pela injeccção de microbios e dos seus productos nos vasos do animal. Extrahia da carotida do animal (cão) uma pequena quantidade de sangue que desfibrinava; injectava em seguida na jugular externa 5 c. c. d'uma cultura de *staphylococcus pyogenes aureus* em emulsão na agua physiologica; passada meia hora, recolhia nova porção de sangue; nos dois especimens de sangue, colhidos respectivamente antes e depois da injeccção virulenta, semeava as bacterias, determinando a energia microbicida por meio das culturas em placas.

Em experiencias preparatorias BASTIN demonstrou que uma sangria moderada, a contenção do animal durante meia hora e a injeccção da agua physiologica não modificavam o poder bactericida do sangue.

As investigações de BASTIN, muito bem conduzidas, levaram-o aos resultados seguintes;

1. A injeccão no sangue d'uma quantidade consideravel de culturas vivas ou esterilizadas de microbios, destroe ou diminue consideravelmente o seu poder bactericida.

2. A abolição do poder bactericida do sangue, depois da injeccão d'uma dose consideravel de microbios, é devida ás substancias segregadas pelos microbios ou encerradas ainda no seu organismo.

3. Existe uma relação directa entre a dose de cultura injectada e o grau de diminuição do poder bactericida.

4. A diminuição do poder bactericida do sangue produz-se immediatamente depois da injeccão da cultura mas tambem se reproduz com bastante rapidez (principia meia hora depois e completa-se passadas cerca de 6 horas).

5. O poder microbicida abolido para uma especie de bacterias deve sel-o tambem para as outras.

As experiencias de BASTIN com o sangue dos animaes em poder da infecção não são menos interessantes. Inoculando em cães o bacillo do edema maligno, o *b. aerogeneo* e o *staphyl. pyog. aur.* produziu infecções locais que rapidamente se generalizaram; verificando então que o poder bactericida do sangue tinha desaparecido ou diminuido consideravelmente, o auctor conclue:

1.º Que deve acontecer o mesmo em muitas infecções geraes, resultantes de infecções primitivamente locais;



2.º O grau d'aquella diminuição parece estar em relação directa com a intensidade da infecção ;

3.º Em geral, o apparecimento dos microbios no sangue parece coincidir com a abolição ou pelo menos com a diminuição notavel do seu poder bactericida.

Em duas mulheres, portadoras de abcessos da mamma, com febre bastante elevada, BASTIN verificou que o seu sangue exercia sobre o staphyl. pyog. aur. uma acção bactericida muito mais energica do que o extrahido de dois individuos em estado de saude; este facto, leva-nos plausivelmente a admittir que nas infecções ligeiras o poder bactericida do sangue augmenta pelo menos para a especie microbiana que produziu a infecção.

PETRUSCHKY deu ás suas experiencias uma orientação differente. Para estudar no proprio animal a acção dos humores organicos sobre o *b. anthracis*, PETRUSCHKY introduzia no tecido cellular subcutaneo do coelho um saquinho de «*tripa*» bem fechado contendo a cultura carbunculosa; as paredes do sacco impediam a penetração dos leucocytos e a sahida dos bacillos mas não obstavam á entrada do liquido intercellular. Protegidas por esta fórma contra qualquer influencia phagocytaria, as bacterias appareciam mortas passado pouco tempo.

Estas experiencias, repetidas mais tarde por

PEKELHARING (1892), TRAPEZNIKOFF (1891) e SANARELLI (1893), deram resultados contradictorios: o primeiro d'estes auctores chegou a conclusões identicas ás de PETRUSCHKY ao passo que os dois ultimos, empregando saquinhos de collodio, observaram o desenvolvimento dos esporos do carbunculo, permanecendo vivas as bacterideas durante muito tempo.

Esta differença nos resultados das experiencias talvez deva attribuir-se á menor permeabilidade das paredes dos saquinhos de que se serviram SANARELLI e TRAPEZNIKOFF; quando a membrana filtrante é de póros muito finos acontece que alguns dos elementos de constituição molecular complexa dos liquidos organicos, como o sôro, são retidos total ou parcialmente.

TRAPEZNIKOFF, introduzindo na camara anterior do coelho esporos do *b. subtilis* e do *b. megaterium* verificou que o humor aquoso oppunha-se ao desenvolvimento das fórmas adultas das duas bacterias e destruia os proprios esporos; a resistencia dos esporos do carbunculo á acção da lymphá do animal, se para o futuro fôr confirmada por experiencias decisivas, constitue portanto uma excepção que se harmoniza perfeitamente com a susceptibilidade do coelho para o *b. anthracis*.

Os resultados das investigações dos auctores precedentes foram contestados vivamente de di-

versos lados, sobresahindo n'esta campanha contra o *humorismo* o illustre fundador do *phagocytismo*, METCHNIKOFF, que, com uma actividade verdadeiramente prodigiosa, nas revistas Francezas, Inglezas, Allemãs e Russas, tem impugnado a todo o momento a legitimidade das conclusões dos adversarios.

Mencionemos algumas das experiencias com que se pretende contestar a acção bactericida do sangue.

HAFFKINE (1890) verificou que o bacillo typhico, cultivado no humor aquoso e bem adaptado á vegetação n'este meio, soffre a principio uma redução sensivel quando se transporta bruscamente para o caldo nutritivo ordinario, isto é, para um meio evidentemente destituído de propriedades bactericidas.

CHRISTMAS (1891) observou egualmente que os bacillos carbunculosos, cultivados no sôro, morrem em grande numero quando se transportam para o caldo nutritivo.

METCHNIKOFF (1889) mostrou que os bacillos de DAVAINE, vegetando no sangue de cobayas e coelhos carbunculosos, quando se semeiam no sangue de coelhos, multiplicam-se desde os primeiros momentos.

SZÉKELI, SZANA e JETTER (1892) attribuem ainda á mudança de meio a diminuição inicial das bacterias semeadas no sôro ou no sangue JETTER apoia-se nas seguintes razões:

a) falta de relação entre o poder microbicida

do sôro d'um animal e o seu grau de resistencia á infecção;

b) o numero de bacterias destruidas pelo sôro, sendo proporcional ao numero das sementes, não pôde resultar d'uma acção antiseptica;

c) a destruição das bacterias, opera-se com intensidade identica á observada no sôro, quando se transportam da gelose para o caldo de carne;

d) o poder bactericida é devido principalmente aos saes do sangue.

Para mostrar a inanidade d'estas objecções, opostas á existencia das propriedades bactericidas do sôro, bastaria recordar as experiencias de BUCHNER; entretanto, preferimos dar conta d'um trabalho notavel de J. DENYS e KAISIN que as rebate victoriosamente.

DENYS e KAISIN (1893) operaram com o sangue desfibrinado do coelho e do cão, observando a sua acção sobre o *b. anthracis* (1) e o *b. coli comm.* Para determinar a marcha, progressiva ou regressiva, do numero de microbios recorreram ao processo de cultura em placas ou tubos rolados, segundo a technica já indicada, e ao exame microscopico.

(1) DENYS reflecte com razão que esta bacteria, apesar de insistentemente empregada n'esta ordem d'experiencias, é todavia a mais impropria por constituir o parasita por excellencia do sangue.

O exame microscopico revela o momento em que as bacterias principiam a multiplicar-se, o qual coincide com o apparecimento das fórmas microbianas em cadeia; póde apreciar-se o progresso da pullulação pelo comprimento das cadeias, a sua abundancia, o numero de individuos livres e emfim a importancia das zooglêas.

O estudo de DENYS não só annulla as objecções acima formuladas mas tambem outras, como se verá pelos resultados das suas experiencias que transcrevemos na integra:

1.º O bacillo commum do intestino, transportado de sangue a sangue, soffre uma diminuição tão forte como quando é transportado da gelose para o sangue. A diminuição não póde, portanto, explicar-se pela mudança brusca de meio.

2.º Não ha proporcionalidade entre o numero de bacillos semeados e o numero de sobreviventes. Quantos mais bacillos se introduzem no organismo, menos morrem: nota-se além d'isso que, se se semeia largamente, a pullulação, de tardia, torna-se precoce.

3.º Duas hypotheses podem explicar a conservação d'um grande numero de organismos e a pullulação precoce:

a) A introducção, com os bacillos, de productos microbianos muito favoraveis ao seu desenvolvimento;

b) A introducção, com os bacillos, de productos microbianos exercendo uma acção neutralizante sobre a substancia bactericida.

Rejeitamos a 1.<sup>a</sup> interpretação:

a) Porque os productos suppostos favoraveis á multiplicação são egualmente levados com as sementeiras pouco abundantes;

b) Porque a addição de cultura morta aos bacillos vivos não favorece a multiplicação na medida que teriamos o direito d'esperar d'esta addição;

c) Porque misturando-se ao sangue principios muito nutritivos (peptona 1 ‰, glucose e extracto de carne 0,5 ‰) não se impede os microbios de succumbir.

Estes principios alimentares de primeira ordem conservam no sangue o seu valor nutritivo.

Adoptamos a 2.<sup>a</sup> interpretação: a destruição incompleta e a pullulação precoce são devidas á presença nas culturas de productos antagonistas da substancia microbica.

4.<sup>o</sup> O facto da repullulação consecutiva á destruição não deve ser interpretado por uma adaptação ao meio. E' a consequencia:

a) Da extincção gradual da potencia bactericida no sangue extravazado;

b) Da acção antagonista dos productos microbianos sobre o poder bactericida.

Podemos proval-o imitando o renovamento do sangue e da lympha, que a circulação opéra incessantemente, no animal, na região infectada. Para isto, junta-se de tempos a tempos sangue fresco ao sangue no qual os microbios são em via de multiplicação e, pela numeração das colonias, verifica-se que cada addição de sangue é seguida

d'uma diminuição do numero de microbios. Deve admittir-se que o poder bactericida *in vitro* não é senão uma manifestação enfraquecida d'este mesmo poder durante a vida. A extincção gradual do poder bactericida explica muito bem a pullulação, sem que se deva ver no depauperamento microbiano um phenomeno d'adaptação.

5.º Deve admittir-se a existencia do poder bactericida durante a vida, por dois motivos:

a) Se se injectam productos microbianos, mesmo em fraca dose, nos vasos, o sangue recolhido pouco tempo depois tem perdido em parte ou na totalidade a sua influencia bactericida;

b) A doutrina do poder bactericida exige que nas scepticemias este poder seja abolido no momento da generalização no sangue e, pelo contrario, seja conservado por tanto tempo quanto a infecção resta localizada. O estudo do poder bactericida do sangue no coelho harmoniza-se perfeitamente com estes principios. Elle é supprimido quando os bacillos apparecem no sangue, como FLÜGGE e LUBARSCH já demonstraram; durante o periodo de localização, é conservado. No coelho, é mesmo a maior parte das vezes augmentado; no cão, o augmento é constante.

6.º O poder bactericida, abolido para o bacillo carbunculoso, é-o tambem para o bacillo commun.

7.º A objecção tirada da ausencia de correlação entre o poder bactericida e a immuidade natural não é fundada porque se ha comparado o sangue

de animaes no estado de saude e de animaes encontrando-se sob a influencia d'uma infecção.

No cão, um effeito constante da infecção é um augmento do poder bactericida do sangue não só para o bacillo carbunculoso, mas tambem para o bacillo do intestino.

No coelho, no principio da infecção, verifica-se geralmente o mesmo augmento. Nos casos em que o não observamos, pôde admittir-se que era de duração muito curta. Depois de algum tempo, desapparece e, quando os bacillos começam a pullular no sangue, o poder acha-se abolido. E' sem duvida esta abolição que permite a generalização.

8.º Os resultados obtidos por JETTER, contrarios á existencia do poder bactericida, são sem alcance:

a) Porque elle não semeou o sangue que estudava com bacillos provenientes de culturas no sangue;

b) Porque não se assegurou de que o seu *agar* possuia qualidades nutritivas necessarias. Como as nossas experiencias demonstram, não se obtem o desenvolvimento adequado ao numero de organismos semeados, se não juntarmos á gelose uma certa quantidade de gelatina. A não observancia d'esta precaução basta para explicar os resultados contradictorios verificados por este auctor.

DENYS, n'um trabalho ulterior (1894) de collaboração com J. HAVET, modificou a opinião ex-



pressa nas proposições precedentes, especialmente pelo que respeita ao poder bactericida do sôro do cão.

Tendo conseguido, por filtração, privar o sangue dos globulos brancos, verificou que n'estas circunstancias o poder microbida diminuia consideravelmente; a acção bactericida recuperava a energia primitiva pela addição, ao sangue filtrado, de globulos brancos recolhidos d'um exsudato pleural provocado artificialmente.

O sangue privado de globulos brancos e o sôro do cão possuem um poder bactericida sensivelmente igual; no sangue *completo* (apenas desfibrinado) d'este animal, os leucocytos contribuem com a parte principal para o seu poder bactericida.

Operando com o sangue, obtido por phlebotomia, de dois homens, um saudavel e outro alcoolico e epileptico, observou que a separação ou a conservação de leucocytos não influiu no seu poder bactericida; no homem, o sôro, o sangue privado de globulos brancos e o sangue completo actuam com a mesma intensidade.

As experiencias de DENYS affirmam ainda que o aquecimento a 55°, durante uma hora, do sôro do homem, destroe as suas propriedades microbidas; esta destruição não é devida, como alguns auctores pretendem, á perda de anhydrido carbonico porque o sôro não readquire o seu poder bactericida fazendo-o atravessar por uma corrente d'aquelle gaz.

Com o sangue de gallinha, os resultados foram mais notaveis: o sôro actuava com maior energia do que o proprio sangue. No pombo, o sôro e o sangue completo mostram-se por egual nocivos ás bacterias; como no homem, o tratamento pelo anhydrido carbonico não confere ao sôro aquecido a sua primitiva actividade.

Em summa, o segundo estudo de DENYS, demonstrando a parte activa que os leucocytyos tomam na destruição das bacterias, especialmente no cão, confirma egualmente o poder bactericida proprio do sôro que, no homem e n'outros animaes, é muito accentuado.

As experiencias de J. LECLEF (1894) não deixam subsistir a menor duvida sobre a acção esporicida do sôro, anteriormente contestada por METCHNIKOFF, TRAPEZNIKOFF, etc. Os resultados contradictorios, já indicados, obtidos por PETRUSCHKY, PEKELHARING, TRAPEZNIKOFF e SANARELLI com os esporos do *b. anthracis*, podiam resultar como dissemos da escolha da especie microbiana mais impropria para reconhecer as propriedades antisepticas do sôro; em geral, a bacteridea vegeta admiravelmente no sangue dos animaes e, portanto, da mesma maneira que o phagocytismo dos leucocytyos se mostra impotente para destruil-a, não deverá extranhar-se tambem que o sôro actue contra ella com menos efficacia do que contra os outros microbios.

Esta e outras razões determinaram LECLEF a rejeitar o bacillo do carbunculo, preferindo os esporos de dois saprophytas — o *b. subtilis* e o bacillo da batata; operou com o sôro de coelho, recorrendo ao processo da cultura em placas, das diluições successivas e ao exame microscopico.

As investigações de LECLEF demonstram que —

1.º o soro tem uma acção esporicida notavel;  
2.º a substancia esporicida é identica á bactericida porque

a) é destruida pelo aquecimento do sôro a 60°,  
b) não actua senão em presença de certos saes (chloreto de sodio),

c) não perde a sua actividade pela addição ao sôro de substancias alimentares das bacterias (caldo, etc.);

3.º na acção bactericida do sôro não pôde fazer-se intervir a mudança de meio porque ella exerce-se com identica intensidade perante os esporos;

4.º a presença de alimentos, em grande quantidade, não impedindo a destruição dos microbios no sôro, é porque essa destruição resulta da acção d'uma substancia antiseptica e não da miseria nutritiva do meio.

LECLEF, em trabalho posterior (1894) estudou a relação entre a intensidade da acção bactericida do sôro d'uma especie animal e o grau de virulencia dos microbios para essa especie.

NUTTALL, NISSEN, etc., tinham já mostrado que d'uma maneira geral a acção bactericida dos li-

quidos do organismo diminuia proporcionalmente ao poder pathogeneo das bacterias ; pelo contrario, os partidarios da phagocytose, apoiados em experiencias isoladas e sem dosar previamente a virulencia do microbio nem a parte que no phenomeno da destruição dos germens pelo sôro pertencia á mudança de meio, sustentavam desde ha muito (como continuam a affirmar) que a falta de relação entre o grau de virulencia d'uma especie bacteriana e a sua resistencia ao sôro constituia precisamente a prova mais convincente contraria á theoria humoral.

DENYS, como vimos, demonstrou quanto era infundado este argumento observando que não podia comparar-se a energia microbocida do sôro d'um animal no estado de saude e quando sob a influencia d'uma infecção ; LECLEF, n'uma serie d'experiencias systematicas, atacou de frente o problema, verificando que as bacterias resistem tanto melhor ao sôro do coelho quanto maior é a sua virulencia para o animal.

LECLEF experimentou com 5 bacterias pathogeneas e 5 saprophytas ; o grau de virulencia, comprovado para cada cultura por inoculação prévia no coelho, corresponde quasi exactamente ao grau de resistencia ao sôro, como indica o quadro seguinte :

	Virulencia por ordem decrecente	Resistencia por ordem decrecente
B. patho- geneas	{ B. da septicemia do coelho B. pyocyanico Staphyl. pyog. <i>Proteus vulgaris</i> Coli-bacillo	{ B. pyocyanico B. da septicemia do coelho Staphyl. pyog. <i>Proteus vulgaris</i> Coli-bacillo
B. sapro- phytas	{ <i>B. subtilis</i> Um cocco rosado Um cocco da putrefacção Um cocco amarello-canario Um bacillo indeterminado	{ <i>B. subtilis</i> Cocco rosado Cocco da putrefacção Cocco amarello-canario B. indeterminado

Das 10 bacterias, apenas o b. pyocyanico, que é menos virulento para o coelho do que o da cholera das gallinhas, resistiu todavia um pouco mais ao sôro; este caso excepcional não inibe de deduzir do resultado de numerosas experiencias a conclusão geral de que existe uma relação intima entre o poder pathogeneo dos microbios e a sua resistencia ao sôro. Mais notavel ainda é que, na mesma especie microbiana, a variedade mais pathogenea é a menos attingida pelo sôro, como VAN DE VELDE demonstrou para o staphyl. pyog. e LECLEF para o b. da septicemia do coelho (1).

(1) Acreditamos que a relação entre o poder bactericida e a virulencia do microbio não é tam geral como poderá deprehen-der-se das experiencias de LECLEF e VAN DE VELDE; entretanto, só novas investigações esclarecerão este ponto.

H. VAN DE VELDE (1894) depois de exaltar a virulencia do staphylococco por passagens successivas na pleura do coelho, observou que o sangue, o sôro e a parte liquida d'um exsudato pleural do animal destruíam muito menos intensamente esta fôrma em extremo virulenta do que a primitiva, attenuada. No cão, contra o que poderia presumir-se, as duas fôrmas do staphylococco manifestaram identica virulencia; tambem, facto notavel, os humores do animal actuavam sobre ellas com a mesma energia.

No estudo de VAN DE VELDE encontra-se a prova de que os staphylococcos segregam substancias (*lysinas* de KRUSE) que neutralizam a acção bactericida dos humores; para verificar o phenomeno, basta adicionar aos liquidos organicos culturas filtradas de staphylococcos no caldo, no sôro ou no exsudato pleural: os liquidos, primitivamente nocivos aos microbios, transformam-se instantaneamente em excellentes meios de cultura.

\*

\* \*

Nos trabalhos que acabamos de analysar encontram-se elementos para poder affirmar com

certeza a acção bactericida do sôro e dos humores do organismo; não julgamos, pois, que haja conveniencia em avolumar mais aquella já longa resenha de documentos, alguns dos quaes verdadeiramente notaveis pela multiplicidade dos processos de technica e clareza de deducção, numero e precisão das experiencias. Entretanto, como os defensores mais zelosos da theoria phagocytaria persistem tenazmente na negação absoluta do poder microbicida dos homores, apreciemos de relance a importancia das razões em que se apoiam.

A — *A destruição dos microbios é devida á mudança brusca de meio.*

E' este, por assim dizer, o argumento supremo dos adversarios do *humorismo*. A principio poderia, em verdade, attribuir-se-lhe um certo valor, ainda que elle estivesse em desaccordo frisante com a differença radical de actividade do sangue *natural* e do sangue aquecido a 60°, assim como não se harmonizasse com muitos dos resultados de experiencias já antigas de BUCHNER, NISSEN, etc.; depois, porém, que os investigadores (DENYS, LECLEF, HAVET, VAN DE VELDE, etc.) corrigiram esta causa d'erro, quer empregando a sementeira recolhida d'um liquido identico áquelle sobre que se experimentava, quer determinando previamente a percentagem de bacterias mortas imputavel á mudança de meio, mal se explica como continua a

recorrer-se a uma objecção que não tem razão de ser.

B — *A destruição dos microbios é seguida de repullulação, facto este que prova igualmente que se trata d'uma simples adaptação a um novo meio.*

A repullulação das bacterias deve-se interpretar por uma maneira muito diversa, como se vê do resultado das experiencias de DENYS (pag. 49, n.<sup>os</sup> 3 e 4), de VAN DE VELDE (pag. 58) etc.

C — *Para matar a bacteridea é necessario empregar um antiseptico em dose muito maior do que para impedir o seu desenvolvimento (LINGELSHEIM); ora, os humores do organismo apresentam propriedades diametralmente oppostas: destroem em larga escala as fôrmas adultas da bacteridea mas não evitam a germinação dos esporos; portanto, aquella destruição não podendo imputar-se a uma substancia antiseptica, deve attribuir-se á mudança de meio.*

Se os partidarios da phagocytose mostrassem experimentalmente que os liquidos da economia não se oppunham á germinação dos esporos ou não dizimavam as fôrmas vegetantes que d'elles successivamente nasciam, poderiam concluir que era bem a falta de adaptação ao meio que intervinha na acção nociva dos humores contra as bacterias; mas, como foi precisamente o contrario que LECLEF



demonstrou para os esporos do *b. subtilis* e do bacillo da batata, não ha motivos para aceitar a sua opinião. As experiencias com a bacteridea carbunculosa não resolvem o problema porque —

a) deram resultados contradictorios nas mãos de differentes investigadores;

b) a bacteridea recusa-se frequentemente a vegetar nos meios nutritivos ordinarios das placas (DENYS e KAISIN);

c) o sangue e o sôro constituem meios nutritivos particularmente favoraveis á bacteridea.

D — *A destruição é proporcional ao numero de microbios semeados; portanto, a sua causa reside não nos humores mas nos microbios.*

Não é exacto que o numero de microbios mortos seja proporcional ao dos semeados: sabe-se desde os primeiros trabalhos de NISSEN e BUCHNER que a acção do sangue e do sôro é tanto mais energica quanto menor é o numero das bacterias; portanto, devemos concluir que *a causa da destruição reside não nos microbios mas nos humores.*

E — *O poder bactericida não é uma propriedade do sangue em circulação, mas apparece unicamente depois da sua sahida do organismo.*

Esta objecção constituiria uma affirmacão puramente gratuita e como tal inadmissivel se as experiencias de BASTIN (pag. 43) obedecendo a

uma technica já seguida por NISSEN, não tivessem vindo anniquilal-a directamente.

F — *O poder bactericida não está em relação com a resistencia do animal á infecção.*

Lembremos que as condições do animal no estado de saude e durante a infecção são muito dissemelhantes para que haja o direito de deduzir de experiencias n'um, os effeitos que se desenvolverão no outro (exp. de DENYS, pag. 51, n.º 7, de BASTIN, pag. 43, etc.); por outro lado, a demonstração directa de que existe aquella correlação, pelo menos n'alguns animaes, fica dada nas experiencias de LECLEF para 10 especies de microbios (pag. 57), de VAN DE VELDE e do auctor precedente para duas variedades de duas especies microbianas, assim como já tinha sido verificada por NUTTALL. No capitulo següinte encontraremos novos factos de identica significação.

G — *A acção bactericida do sangue é devida ao acido carbonico* (CHRISTMAS) (1).

(1) CHRISTMAS invoca outros argumentos que não têm mais valor do que o citado; para se apreciar até onde chega a... *incoherencia* d'este auctor, bastará dizer que rejeitando elle as indicações fornecidas pelo methodo das placas, *por ser pouco preciso*, pretende todavia avaliar o desenvolvimento das culturas pelo *exame á vista desarmada* dos tubos de ensaio contendo o sôro!

E' conhecido de todos que o anhydrido carbonico, n'uma percentagem muito mais elevada que a do sangue e em liquidos muito menos nutritivos (nas aguas alcalinas naturaes, por ex.) não impede a vegetação de muitas especies microbianas; não é menos universalmente admittido que uma ligeira differença de temperatura, incapaz de influir na quantidade de gaz contido no sangue, pelo contrario transforma por completo as condições d'este meio de cultura das bacterias; de resto, as experiencias de DENYS (pag. 53) provam d'um modo directo que o anhydrido carbonico não toma parte na acção bactericida do sangue.

\*

\* \*

Algumas experiencias que executámos com o sôro de cabra — animal que até hoje tem sido muito raras vezes empregado n'esta ordem de investigações — comprovam a sua acção bactericida. Nutriamos grande desejo de verificar se para este animal existe, como para o coelho, correlação entre a virulencia do microbio e a sua resistencia ao sôro; a falta, porém, d'uma instalação material appropriada e as exigencias inadivéis de tempo, demoveram-nos do intento.

Exp. I — Repartimos 30 c. c. de sôro por 6 tubos de cultura; semeámos os 3 primeiros (A, B e C) respectivamente com o coli-bacillo, o b. typhico e o b. fluorescente de LÉPIERRE; procedemos da mesma maneira para com os 3 restantes (A<sub>1</sub>, B<sub>1</sub> e C<sub>1</sub>) mas sómente depois de os levar á temperatura de 60° a 62° durante 40 minutos. A materia de sementeira foi retirada de culturas em caldo de carne. Agitando repetidas vezes o sôro, extrahimos sempre com a mesma ansa de platina o liquido de sementeira das placas de gelatina; nos intervallos d'estas inoculações, as culturas em sôro ficavam na estufa a 37°. Nas placas de gelatina, mantidas a 20° na estufa, fizemos a numeração das colonias no fim de 48 a 72 horas.

		Tempo:	immed.				
			dep. da	1 hora			
			sementeira	depois	2 h.	24 h.	
Coli-bacillo.	{ Tubo A — N.º de colonias:	1772	25	0	3100		
	{ " A <sub>1</sub> — " " " "	2816	2560	4352	inn.		
B. typhico..	{ " B — " " " "	640	110	16	1024		
	{ " B <sub>1</sub> — " " " "	512	768	1536	12800		
B. fluor.....	{ " C — " " " "	2176	195	2	2432		
	{ " C <sub>1</sub> — " " " "	256	412	1080	6504		

Estes numeros indicam evidentemente uma acção bactericida do sôro *natural* de cabra; o sôro

aquecido matou tambem algumas bacterias durante a primeira hora mas n'esta destruição só interveio de certo a mudança de meio. Entretanto, o poder bactericida do sôro de cabra, parece bastante inferior ao de outros animaes (coelho, aves, etc.), como poderá verificar-se comparando a marcha da diminuição das bacterias n'esta experiencia com os resultados das experiencias de diversos investigadores; a differença assumirá maiores proporções se attendermos ao pequeno numero de microbios semeados e á quantidade (5 c. c.) relativamente grande de sôro.

De todos os sôros sobre que se tem operado apenas o de sangue de boi não manifesta propriedades nocivas aos microbios; constitue uma excepção, talvez unica, que, sem alcance para combater a theoria da acção bactericida dos liquidos do organismo, poderá pelo contrario auxiliar a caracterização da substancia antiseptica dissolvida nos humores dos outros animaes. Esta circumstancia animou-nos a emprehender algumas experiencias com o sôro de boi; não nos sendo possivel obter o sôro em condições de asepsia rigorosa (nem mesmo de *limpeza* regular) previmos desde o principio que as nossas tentativas seriam

infructuosas. Mencionemos, todavia, algumas d'essas experiências.

Exp. II — 4 tubos d'ensaio, contendo cada um 5 c. c. de sôro, foram aquecidos a banho-maria á temperatura de 60° a 62° durante 40 minutos e em seguida destapados e expostos ao ar n'uma das salas do Gabinete de microbiologia; junto d'elles collocámos ao mesmo tempo outros tantos tubos com egual quantidade de sôro *natural*. Passadas 24 horas, como o sôro se apresentasse completamente limpido em todos os tubos, resolvemos deixal-os na estufa a 37° até ao dia seguinte. Fizemos então a sementeira em placas de gelatina; no fim de dois dias vimos que *se haviam desenvolvido numerosissimas colonias tanto nas placas da primeira serie como nas da segunda*.

Reconhecemos que esta experiencia foi mal conduzida; a sua significação careceria de valor para o fim visado ainda quando se operasse com sôro aseptico; da seguinte, porém, em que procedemos d'outra fórma, não colhemos resultados mais satisfactorios.

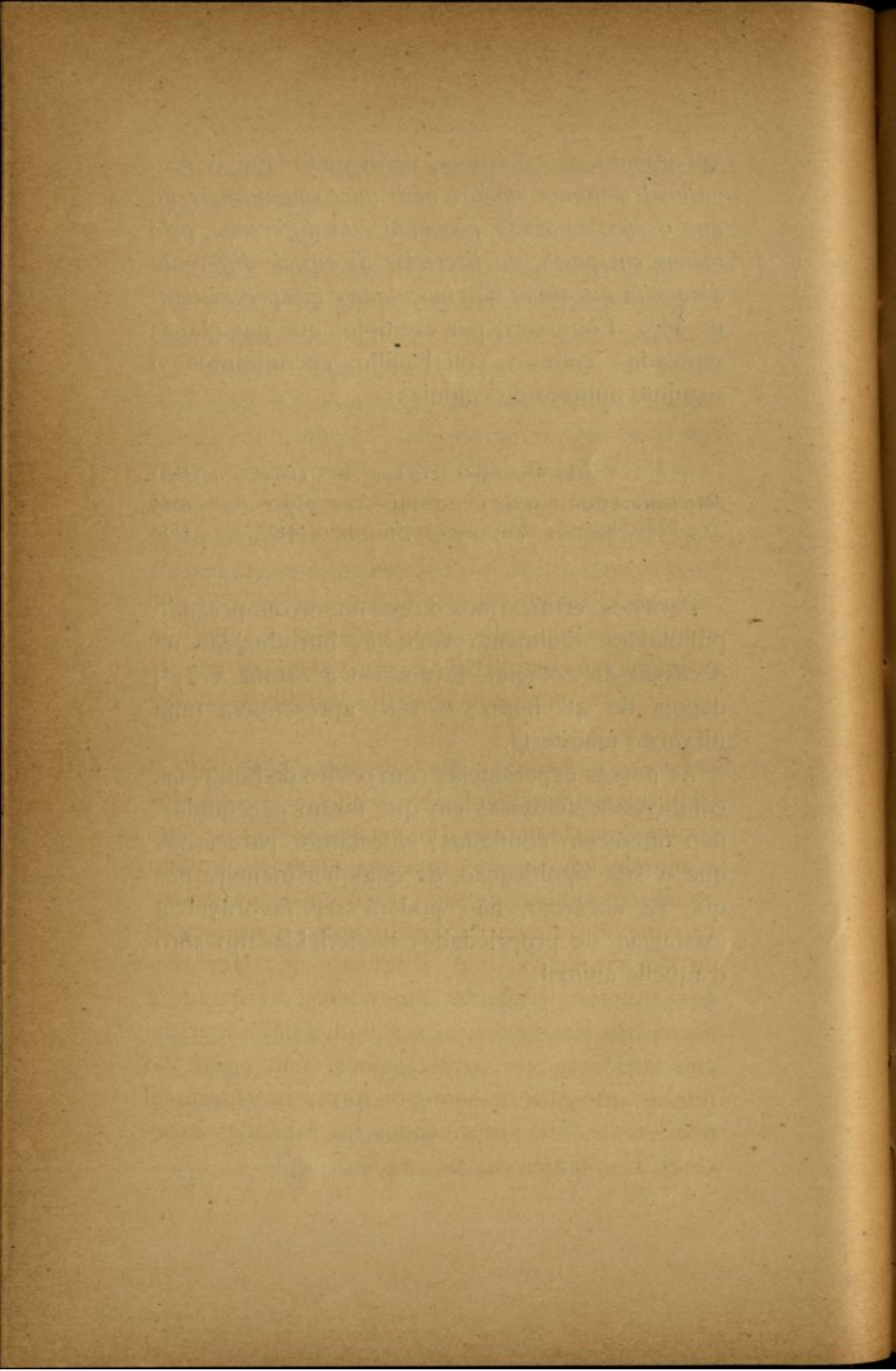
Exp. III — Em 3 tubos d'ensaio, contendo cada um 5 c. c. de sôro, semeámos respectivamente o coli-bacillo, o b. typhico e o b. do carbunculo (esporolado); fizemos identicas sementeiras em 3 tubos de sôro previamente aquecido a 60°. Pelo methodo das placas apreciámos depois o desen-

volvimento das culturas, verificando que o *sôro natural continha muitos mais microorganismos do que o sôro aquecido, provindo esta diferença, pelo menos em parte, de bacterias de especie diferente d'aquelle que tinha sido inoculada e que preexistiam no sôro*. Foi assim, por exemplo, que nas placas semeadas com o coli-bacillo encontrámos o seguinte numero de colonias:

	Immediat. depois	1/2 hora	1 hora	2 horas
Sôro <i>natural</i> —	2592	5040	5760	6336
» <i>aquecido</i> —	720	760	1440	2304

Para nos certificarmos de que no sôro empregado pullulavam realmente bacterias introduzidas na occasião da colheita, levámol-o á estufa a 37°; depois de 48 horas, o sôro apresentava uma turvação manifesta.

As nossas experiencias com o sôro de boi, pelas condições defeituosas em que foram executadas, não offerecem confiança; entretanto, parece-nos que a sua significação, de qualquer maneira por que se encarem, não poderá ser favoravel á existencia de propriedades bactericidas no sôro d'aquelle animal.





Propriedades bactericidas do sôro e dos humores  
dos animaes immunisados

A acção bactericida do sôro e dos humores dos animaes immunisados é hoje geralmente admittida pelos bacteriologistas; não carecemos, porisso, de nos demorarmos na analyse dos trabalhos concernentes ao assumpto.

NUTTALL, NISSEN e METCHNIKOFF, cultivando a bacteridea no sangue de carneiros vaccinados contra o carbunculo e, GAMALEIA, operando com o humor aquoso dos mesmos animaes, tinham notado modificações morphologicas e de desenvolvimento do microbio, assim como a attenuação da sua virulencia; mas, emquanto que METCHNIKOFF referia os effeitos attenuantes do sangue á acção dos leucocytos, os resultados das experiencias dos restantes investigadores não eram tão nitidos que affirmassem por fórma incontestavel a existencia de propriedades microbicidas especiaes, resultantes da vaccinação.

CHARRIN e ROGER (1889) para supprimir a causa d'erro que podesse advir dos leucocytos, empregaram o sôro de coelhos vaccinados contra o bacillo pyocyanico, estudando comparativamente as culturas n'este meio e no sôro normal; d'esta maneira reconheceram que o sôro dos animaes vaccinados destruia um numero consideravel de bacillos, permittindo apenas o desenvolvimento tardio de raras fórmas degeneradas, de funcção pathogenea e chromogenea supprimidas ou diminuidas, e que, só depois d'algumas passagens por meios nutritivos muito favoraveis, recuperavam a primitiva vitalidade. A acção attenuante produz-se tanto *in vitro* como no organismo vivo (CHARRIN) e a substancia bactericida encontra-se não só nos liquidos como tambem nas partes solidas do animal (ROGER).

Nas cobayas vaccinadas contra o carbunculo symptomatico, os mesmos auctores mostraram que o sôro exercia uma acção microbicida notavel e especialmente manifesta quando a sementeira era em pequena quantidade; no sôro normal o desenvolvimento dos bacillos é rapido e abundante, ao passo que as culturas em sôro dos animaes immunisados apparecem turvas sómente depois de 24 a 48 horas e o exame microscopico revela fórmas anomalias, algumas vezes simulando micrococcus, com pequena affinidade para os corantes.

Com o streptococco pyogeneo, ROGER observou (1890) que a inoculação em coelhos *novos* de cultura em sôro normal determinava a infecção

geral seguida de morte enquanto que a cultura em sôro de coelhos immunisados produzia um abcesso circumscripto ou uma erysipela curavel, isto é, lesões identicas ás provocadas no animal immunisado quando se inocula o streptococco virulento; d'estes factos concluiu ROGER que o sôro dos coelhos immunisados attenua a virulencia do streptococco pyogeneo.

Para o vibrião de METCHNIKOFF, BERING e NISSEN (1891) verificaram que o sôro das cobayas immunisadas gosa de propriedades microbicidas energicas, destruindo os vibriões em 3 a 5 horas.

A acção bactericida, conferida pela immunisação, foi ainda demonstrada por ZASSLEIN (1890) no sôro da cobaya vaccinada contra o vibrião de KOCH; por G. H. ROGER (1891) no sôro do coelho vaccinado contra o pneumococco; por BRUSCHETTINI (1892) no sôro do coelho vaccinado contra o bacillo typhico; etc.

METCHNIKOFF contestou desde o principio a significação dada pelos auctores precedentes aos resultados das suas experiencias; mas, de todas as razões que invocou, apenas uma parecia realmente digna de consideração. Alguns investigadores, na verdade, deduziram que o sôro attenuava a virulencia dos microbios pelos effeitos observados após a inoculação nos animaes; ora, ao mesmo tempo que se injectavam as bacterias nos tecidos introduzia-se egualmente uma pequena porção de sôro immunisante e, portanto, a maior resistencia do animal á infecção tanto podia

atribuir-se á menor virulencia d'aquellas como ás propriedades therapeuticas d'este.

Esta objecção não tinha, em ultima instancia, grande valor porque a diminuta proporção de sôro que vehiculava as bacterias era incapaz de produzir efeitos therapeuticos apreciaveis; entretanto, para obviar a este elemento perturbador, nas experiencias subsequentes os auctores trataram de proceder á inoculação dos virus completamente livres de sôro por lavagens no filtro ou pela passagem previa das bacterias para meios de cultura destituídos de propriedades immunisantes. Foi d'esta maneira que ROGER (1892) poz em evidencia mais uma vez a attenuação do streptococco pelo sôro do coelho immunisado e COURMONT (1895) verificou as propriedades bactericidas e attenuantes do sôro do mesmo animal immunisado contra o staphylococco pyogeneo aureo.

Nas cobayas vaccinadas contra a peritonite cholerică, PFEIFFER (1894) observou que a destruição dos vibrões inoculados na cavidade peritoneal operava-se independentemente da influencia directa das cellulas; os vibrões, pouco depois da inoculação, são transformados pelo liquido peritoneal em pequenos granulos arredondados, immoveis, semelhantes a micrococcus. Mais tarde, estes granulos, que representam evidentemente vibrões mortos ou degenerados, dissolvem-se em grande numero no liquido e desaparecem sem a intervenção dos leucocytos (PFEIFFER). O «pheno-  
meno de PFEIFFER» pôde produzir-se na cobaya

*nova*, injectando na cavidade abdominal os vibriões e simultaneamente o sôro preventivo; e, *in vitro*, fazendo actuar sobre os vibriões quer o liquido peritoneal d'uma cobaya a que se injecte previamente na cavidade abdominal sôro preventivo (PFEIFFER) quer o sôro immunisante só ou, melhor, adicionado de sôro normal (BORDET).

A descoberta de PFEIFFER levou METCHNIKOFF a abandonar a intransigencia absoluta em que se mantinha relativamente á acção bactericida dos humores organicos; a divergência dos dois illustres bacteriologistas não deixa todavia de ser profunda não só emquanto á origem da substancia bactericida como pelo que respeita á importancia da destruição extra-cellular dos vibriões no processo da infecção.

Para se apreciar a intensidade da acção bactericida dos humores do animal immunisado, transcrevemos o resultado da seguinte experiencia de BORDET (1895) em que os vibriões (de MASSAOUAH) foram semeados respectivamente no sôro de coelho vaccinado, na serosidade de edema produzido por compressão e no sôro de coelho *novo* (methodo das culturas em placas).

		Tempo: Immediat.	depois 1/2 h.	7/4 h.	4 1/2 h.	16 h.
Sôro de c. vac.	-N.º de colonias -18900	0	0	0	0	0
Edema de c. vac.	" 20000	7	0	2	∞	
Sôro de c. <i>novo</i>	" 24000	2100	780	1200	∞	

DENYS e LECLEF (1895) n'um estudo destinado especialmente a determinar a influencia propria dos humores e dos leucocytos nos phenomenos da infecção, depois de verificarem que o streptococco pyogeneo vegeta mal no sôro dos coelhos vaccinados contra este microbio, mostraram egualmente que *in corpore* a acção antiseptica do exsudato pleural ainda é mais manifesta, desaparecendo rapidamente os microorganismos sem que os leucocytos intervenham directamente.

Para se poder affirmar a generalidade da acção microbida dos humores, adquirida por immunisação, restava ainda considerar o grupo dos sôros particularmente antitoxicos, tanto mais que das experiencias de GABRITSCHESKY (1894), KOUDREWETZKY (1893), etc., parecia deduzir-se que o sôro antidiphtherico constituia um excellente meio de cultura para o bacillo de LOEFFLER; ora, NICOLAS demonstrou (1895) por fórma que não admite contestação, que o bacillo de LOEFFLER vegeta mal e perde a sua virulencia nas culturas em sôro antidiphtherico.

O resultado das experiencias de NICOLAS sobre a vegetabilidade do bacillo da diphteria no sôro de cavallo immunisado é resumido pelo auctor nos termos seguintes:

«O sôro antidiphtherico immunisante a  $\frac{1}{30.000}$ , determina uma demora na vegetação do bacillo de LOEFFLER n'elle semeado, demora pequena (24 horas) nas primeiras gerações, mais notavel nas seguintes (3 dias), para chegar á cessação da

vegetabilidade ou á morte do bacillo na 4.<sup>a</sup> geração no fim de 16 a 26 dias, ou na 3.<sup>a</sup> geração depois de 28 dias de contacto com elle».

«Cultivando o bacillo de LOEFFLER em gerações successivas no sôro antidiphtherico cujo poder immunisante é de  $\frac{1}{50.000}$ , vemos, desde as primeiras gerações, um enfraquecimento rapido da vegetabilidade do microorganismo, por fórmula que, semeado depois de duas gerações de 48 horas, já não se notam vestígios de vegetação na terceira geração feita em sôro antitoxico, e, feita em caldo, encontra-se um enfraquecimento manifesto mas passageiro da vegetabilidade. Se esperarmos que a terceira geração em sôro antidiphtherico tenha 3 dias de idade antes de passal-a para o caldo, o microbio não chega a desenvolver-se. Assim, um contacto de 5 dias do bacillo com o sôro em duas gerações successivas é sufficiente para suspender completamente a sua vegetabilidade e vitalidade».

D'estas experiencias póde concluir-se tambem que o poder microbida do sôro antidiphtherico é directamente proporcional ao seu poder immunisante.

As propriedades attenuantes do sôro são igualmente manifestas.

Na primeira experiencia, NICOLAS semeou em 3 balões de caldo ordinario o bacillo de LOEFFLER retirado respectivamente de 3 culturas de segunda geração e de 48 horas em caldo, sôro normal e sôro antidiphtherico; passadas 48 horas, inoculou uma gotta de caldo de cada cultura em 3 cobayas;

ora, enquanto que as cobayas inoculadas com os bacillos originarios do caldo e do sôro normal morreram em 29 e 25 horas, a cobaya inoculada com os bacillos provenientes do sôro antidiphtherico morreu sómente depois de 40 horas. A maior sobrevida do ultimo animal não póde attribuir-se á pequena porção de sôro antidiphtherico que acompanhou os bacillos na passagem para o caldo porque uma cobaya inoculada ao mesmo tempo com uma gotta de cultura em caldo a que previamente se juntára igual quantidade de sôro antitoxico morreu em 27 horas.

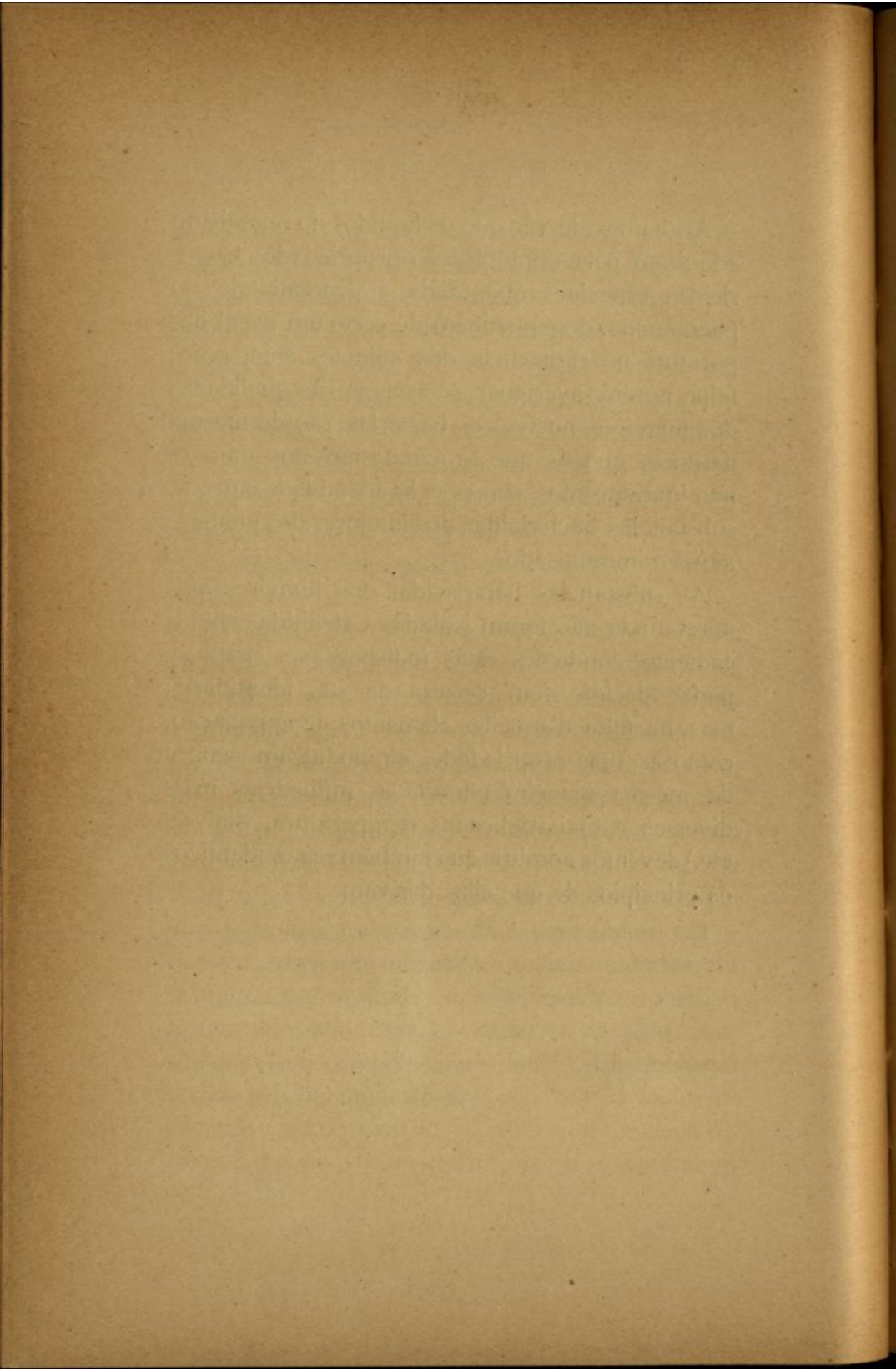
Na segunda experiencia os resultados são mais nitidos.

O bacillo de LOEFFLER de primeira geração cultivado durante 10 dias no sôro normal, no caldo e no sôro antidiphtherico foi semeado separadamente em 3 balões de caldo ordinario; no fim de 48 horas, inoculou-se uma gotta de cada uma d'estas culturas em 3 cobayas de igual peso. A cobaya inoculada com o bacillo proveniente do sôro normal morreu em 30 horas; a cobaya inoculada com o bacillo cultivado constantemente em caldo apresentou no dia seguinte uma tumefacção enorme do membro em que se praticou a injecção e morreu no 16.º dia; enfim, a cobaya inoculada com o bacillo originario do sôro antidiphtherico, não manifestou o mais pequeno signal de infecção local ou geral.



Acabamos de ver que os liquidos do organismo adquirem pela immunisação propriedades bactericidas especiaes que, dada a generalidade do phenomeno, desempenham de certo um papel importante na resistencia dos animaes á infecção; falta, porém, averiguar se estas novas qualidades dos humores, nocivas ás bacterias, são da mesma natureza que as que se manifestam nos animaes não immunisados, isto é, se ha identidade entre as substancias bactericidas dos humores dos animaes *novos* e immunisados.

As substancias bactericidas dos humores animaes ainda não foram isoladas e definidas chimicamente, condições estas indispensaveis para se poder decidir com certeza da sua identidade; mas, na falta d'aquelles elementos de apreciação, como as suas propriedades se modificam sempre da mesma maneira perante as influencias mais diversas e mais delicadas (temperatura, dialyse, etc.) devemos admittir que tambem sejam identicos os principios de que ellas derivam.



### III

#### Poder bactericida e alcalinidade do sôro

Está hoje definitivamente assente, pelas experiencias de BEHRING, BUCHNER, CHOR, ZAGARI, CENI, PANE, etc., que existe em geral uma relação directa entre a intensidade da acção bactericida do sôro e o grau da sua alcalinidade; durante a infecção, a alcalinidade do sôro e a resistencia do animal á infecção tambem caminham parallelamente. Não permittindo os limites d'este estudo referir aqui todas aquellas experiencias, summariemos algumas das mais recentes.

Depois de verificar que *in vitro* a alcalinidade do sôro de coelho influe directamente no seu poder microbicida, FODOR (1895) tratou de investigar o que se passava no animal durante a infecção. Em experiencias previas, bastante numerosas, FODOR dosou a alcalinidade do sangue do coelho, antes e depois de lhe injectar pequenas quantidades de bi-carbonato de soda; com a

administração do medicamento, o sangue torna-se mais alcalino, a sua acção microbicida augmenta e o animal resiste melhor á infecção carbunculosa.

Inoculando a bacteridea no coelho, durante as primeiras horas a alcalinidade do sangue cresce consideravelmente (mais de 20 %); a este periodo de reacção do organismo succede o decrescimento rapido e constante da alcalinidade até á morte do animal.

Quanto maior e mais prolongado fôr o augmento da alcalinidade tanto maior é a sobrevida do animal; nos coelhos parcialmente immunisados contra o carbunculo, a diminuição da alcalinidade é menos accentuada e mais tardia.

A inoculação d'uma cultura do vibrião cholericico forneceu resultados semelhantes: em dois animaes que morreram 24 horas depois, o sangue perdeu respectivamente 25 % e 36 % da alcalinidade primitiva; nos coelhos que sobreviveram, a alcalinidade desceu nas primeiras 24 horas e depois subiu constantemente durante 12 dias.

Nos coelhos inoculados com o bacillo do mal rubro dos porcos, a alcalinidade do sangue augmentou ligeiramente no fim de 24 e 48 horas e a infecção não foi fatal; com o bacillo de EBERTH, a alcalinidade diminuiu 24 % nos animaes que morreram da infecção e apenas 1 a 2 % nos que sobreviveram.

D'estas experiencias e d'outras com o bacillo da tuberculose, FODOR concluiu que quando o organismo reage fortemente contra as bacterias e

domina a infecção, a alcalinidade do sangue tem augmentado notavelmente e conserva-se superior ao seu grau primitivo; nas infecções rapidamente fataes, a alcalinidade decresce de repente e d'um modo progressivo até á morte. Os animaes que primitivamente possuem um sangue mais alcalino, em geral resistem mais á infecção; mas, um animal com o sangue menos alcalino póde excepcionalmente affrontar melhor os effeitos nocivos das bacterias se, após a inoculação, a alcalinidade subir consideravelmente. N'uma palavra, para FODOR, a curva das variações da alcalinidade do sangue durante a infecção segue a da resistencia que a cada momento o animal offerece á doença.

N'um trabalho importante (1894) CALABRESE, empregando methodos rigorosos para a determinação da alcalinidade do sangue de coelho e do poder bactericida do seu sôro, chegou aos resultados seguintes:

1. Na infecção carbunculosa a alcalinidade do sangue mostra-se pouco ou nada alterada até á segunda hora da infecção; mas, na 5.<sup>a</sup>, encontra-se já constantemente augmentada, e vai subindo gradualmente durante as primeiras 20 horas; porém, depois de 24 horas acha-se diminuida relativamente ao estado normal, e vai progressivamente decrescendo até á morte do animal. O poder bactericida acompanha *maravilhosamente* a curva da alcalinidade, isto é, augmenta nas primeiras 24 horas e diminue depois progressiva-

mente até desaparecer por completo quando as bacterias invadem o sangue.

2. Na infecção pyogenea (diplococco pyogeneo isolado por PASQUALE) o poder microbida e a alcalinidade augmentam só nas primeiras 12 horas da infecção e depois baixam notavelmente (morte dos animaes em 36 a 48 horas).

3. Na infecção produzida pelo bacillo diphterico, a alcalinidade, em vez de augmentar, diminue até á 5.<sup>a</sup> hora da infecção e o poder bacterida encontra-se completamente exgottado (morte dos animaes em menos de 24 horas).

4. Na infecção pelo virus rabico fixo, a alcalinidade do sangue modifica-se pouco ou não soffre alteração durante todo o periodo de incubação; mas, logo que se desenvolve a infecção, isto é, no periodo de excitação e depois de paralytia, nota-se uma constante diminuição, posto que pequena, do grau de alcalinidade do sangue.

CALABRESE, em experiencias ulteriores (1895) demonstrou egualmente que nos animaes immunizados por diferentes processos a alcalinidade do sangue vai subindo á medida que augmenta o grau de immunisação e attinge o seu maximo quando o estado refractario é completo.

Sabe-se desde os trabalhos de BUCHNER que o sôro perde as suas propriedades microbidas pelo aquecimento a 55°; ora, EMMERICH, TSUBOI, STEINMETZ e Löw verificaram que para regenerar, pelo menos em parte, a actividade d'este sôro bastava addicionar-lhe pequenissimas quantidades

de hydrato de potassa. Da mesma maneira, o sôro conservado *in vitro* durante alguns dias torna-se inactivo porque a sua alcalinidade diminue rapidamente; e se, como demonstrou EMMERICH, acidificarmos ligeiramente o sôro recentemente extrahido do animal, juntando-lhe uma pequena percentagem de acido sulfurico ( $0,67 \text{ ‰}$ ), transformamol-o n'um excellentê meio de cultura.

A alcalinidade do sangue, o poder bactericida do sôro e a resistencia do animal á infecção são, pois, condições organicas intimamente relacionadas entre si e dependentes umas das outras; esta correlação e dependencia, perfeitamente clara e comprehensivel nas duas ultimas, suggere-nos desde já algumas reflexões relativamente á primeira.

Por que mechanismo influe a alcalinidade do sangue nas propriedades microbicidas do sôro e na defesa do animal contra as bacterias?

E' evidente que não se trata aqui d'uma acção directa dos corpos inorganicos, de reacção alcalina, dissolvidos no plasma sanguineo; pelo contrario, sabemos que nas culturas artificiaes os microbios vegetam muito melhor quando o meio é ligeiramente alcalino. Emquanto aos effeitos observados na resistencia do animal á infecção, poderia admittir-se que a actividade dos phagocytos augmenta proporcionalmente á alcalinidade do sangue; mas, acceitando esta hypothese, inteira-

mente infundada, como explicar o augmento correspondente do poder bactericida do sôro?

A influencia da alcalinidade do sangue sobre o processo da infecção não podendo attribuir-se nem a uma acção propria e directa dos corpos inorganicos n'elle dissolvidos nem á maior actividade dos phagocytos, devemos acreditar que, quando o meio hematico se torna mais alcalino, a substancia bactericida, contida nos elementos cellulares, se diffunde em maior quantidade nos liquidos do organismo; esta interpretação é a unica que se harmozisa com todos os phenomenos observados.



## IV

### Substancia bactericida do sôro

O facto notavel do sôro conservar intacta a sua actividade microbica quando aquecido a 50° ou 54°, perdendo-a por completo a uma temperatura superior apenas em um ou dois graus, convence-nos de que aquella actividade deriva d'uma substancia muito instavel; não póde pensar-se em que o principio activo do sôro desapareça por volatilização porque, n'esta hypothese, as propriedades bactericidas attenuar-se-iam lenta e progressivamente com a elevação da temperatura, não se extinguindo de repente logo que se attinge um determinado grau de calor.

BUCHNER deduziu das suas experiencias, a que já nos referimos, que a acção microbica pertencia á albumina do sôro; o calor alteraria a composição chimica da molecula ou a estrutura *micellica* do albuminoide. A existencia d'um corpo de natureza alcaloidea, deveria pôr-se de parte, em virtude

da desigual distribuição do principio activo no sôro previamente submettido a uma serie de congelações e degelos successivos.

DUCLAUX (1889) julga mais plausivel a interpretação de que o sôro deve as suas propriedades bactericidas a uma diastase porque —

—a) a temperatura de 55° torna o sôro inactivo mas não modifica as suas reacções chimicas nem os seus caracteres physicos;

—b) conservando o sôro a sua actividade fóra do organismo por bastante tempo, não podemos attribuil-a a uma certa persistencia da vida no sôro e no sangue, tanto mais que o de boi, por ex., mesmo recente, não é nocivo ás bacterias;

—c) os resultados da dialyse explicar-se-iam melhor na hypothese d'uma diastase que a diffusão dos saes levasse á precipitação directa, como acontece com diversas diastases ou fizesse unil-a, como acontece com todas, ao deposito fluctuante e insolúvel de materia albuminoide que deriva do desaparecimento dos saes do sôro.

Para OGATA e JASUHARA (1891) as propriedades bactericidas do sôro resultariam de enzymas que elles conseguiram extrahir por meio da glicerina. Eis o processo de preparação:

Trata-se uma parte de sangue ou de sôro (operaram com o sangue de cão e de gallinha) por 10 a 15 partes de mistura alcooleo-etherea durante 48 horas; filtra-se, secca-se o precipitado e addiciona-se-lhe agua glicerinada a 50 % em quantidade egual á do sôro ou sangue empregado;

depois de 5 minutos passa-se por um panno e filtra-se em seguida por papel; junta-se ao liquido de filtração uma mistura em partes eguaes de alcool e de ether, de volume 10 vezes maior, e no fim de 24 horas recolhe-se no filtro um precipitado branco e floccoso.

A substancia assim isolada é soluvel na agua e na glicerina e insoluel no alcool e no ether; apresenta propriedades bactericidas que desapparecem pelo aquecimento a 45°, pela addição de pequenas quantidades de acido phenico ou chlorhydrico mas não se modifica pelos alcalis fracos; além de antiseptica, a substancia é igualmente immunisante e, quando dissolvida em glicerina, a sua actividade persiste por muito tempo sem alteração sensivel.

Com o soluto aquoso-glycerinado d'esta substancia, OGATA e JASUHARA pretendem ter immunisado alguns animaes contra o carbunculo e o bacillo do mal rubro dos porcos; PETERMANN (1891) e outros investigadores, experimentando em condições precisamente identicas ás d'aquelles auctores, não confirmaram as suas asserções.

HANKIN (1891) estudou, sob o ponto de vista das propriedades germicidas, a *cell-globulina*  $\beta$  de HALLIBURTON. O processo de preparação adoptado por HANKIN foi o seguinte:

As glandulas lymphaticas do cão ou do gato, depois de privadas tanto quanto possivel de gordura e de tecido conjunctivo, são divididas em pequenos fragmentos e tratadas por uma solução

de sulfato de soda a  $1 \times 10$ ; no fim de 24 horas, filtra-se e precipita-se por um excesso de alcool a *cell-globulina* dissolvida no liquido; recolhe-se então o precipitado n'um filtro e lava-se com alcool absoluto.

Para verificar as propriedades bactericidas da *cell-globulina*, HANKIN dissolvia-a em agua, junta-va-lhe uma pequena quantidade de cultura em caldo do *bacillus anthracis* e, em periodos regulares de tempo, procedia á contagem dos bacillos pelo methodo das placas. HANKIN conclue das suas experiencias que —

— a) a *cell-globulina*  $\beta$  de HALLIBURTON possui propriedades germicidas notaveis; e,

— b) debaixo d'este ponto de vista, differe do fermento da fibrina;

— c) as propriedades bactericidas d'esta substancia parecem identicas ás do sôro, descriptas por BUCHNER, NISSEN e NUTTALL;

— d) a acção microbica do sôro é devida provavelmente a este ou a um corpo analogo.

BITTER, repetindo as experiencias de HANKIN, contesta que a *cell-globulina*  $\beta$  de HALLIBURTON exerça qualquer acção bactericida.

CHRISTMAS (1891) isolou das visceras (baço, fígado, rins, coração e pulmões) de coelhos immunisados contra o carbunculo uma substancia dotada de propriedades bactericidas energicas para a bacteridea. Do animal, morto por etherização, extrahiu as visceras, reduziu-as a polpa e tratou-as pela glycerina durante 24 horas; fíltrou, addicionou

ao liquido 5 vezes o seu volume d'alcool, obtendo assim um precipitado que, depois de lavagem pelo alcool absoluto para remover a glicerina, foi dissolvido na agua; fez atravessar este soluto por uma corrente de ar durante algumas horas a fim de o desembaraçar do alcool e, depois de nova filtração, ensaiou a sua acção bactericida.

Todas as operações foram executadas em condições de asepsia rigorosa.

O soluto preparado por CHRISTMAS, impedia o desenvolvimento da bacteridea, ainda quando se juntasse a meios de cultura muito favoraveis, como o sôro ordinario ou o caldo nutritivo; a sua actividade desapparecia pelo aquecimento a 75°. O auctor hesita em attribuir estas propriedades quer á influencia do «primeiro estabelecimento» (DUCLAUX) quer á existencia d'uma diastase derivada das substancias vaccinantes do organismo do coelho.

Operando com órgãos de coelhos normaes, CHRISTMAS conseguiu pelo mesmo processo extrahir albuminoides cujas soluções, semeadas com a bacteridea, restavam estereis.

As investigações ulteriores de BITTER, confirmaram os resultados das experiencias de CHRISTMAS; mas, para aquelle auctor a substancia isolada não deve considerar-se identica ao principio bactericida do sôro porque, emquanto que este é destruido com certeza pelo aquecimento a 65°, as soluções d'aquella, levadas á mesma temperatura, matam

ainda cêrca de 30.000 a 40.000 bacillos typhicos em quatro horas.

N'uma critica d'estes trabalhos, BUCHNER emite egual opinião: «Um methodo dado por CHRISTMAS para a preparação de soluções germicidas dos órgãos de coelhos normaes foi tambem experimentado por BITTER. As soluções germicidas foram em verdade obtidas, as quaes, entretanto, differem materialmente do sôro activo, pois em tres experiencias, apesar do aquecimento a 65°, permaneceu a acção bactericida».

BUCHNER affirma ainda que as soluções dos albuminoides do sôro, precipitados pelo alcool, são destituídas de propriedades microbicidas; as experiencias de CHRISTMAS e de BITTER, porém, demonstram precisamente o contrario.

CHRISTMAS, precipitou o sôro por 3 vezes o seu volume d'alcool forte, filtrou, lavou o precipitado pelo alcool, deixou-o evaporar e dissolveu-o em volume d'agua egual ao do sôro empregado; esta solução possuia um poder microbicida notavel, maior do que o do proprio sôro, que se destruia, pelo menos em grande parte, pelo aquecimento a 60° durante uma hora.

As investigações de BITTER são egualmente significativas. Citemos uma das suas experiencias:

«A 50 c. c. d'alcool adicionaram-se 10 c. c. de sôro e, depois de agitar a mistura, separou-se immediatamente o precipitado por filtração. O precipitado foi privado d'alcool por meio de pressão entre folhas de papel-filtro, secco a 37° e lançado

em 10 c. c. d'agua esterilizada. Deixando o liquido a 37° durante pouco tempo, o precipitado dissolveu-se quasi completamente. A soluçãõ foi ensaiada depois de nova filtraçãõ».

Devemos notar que, não se tendo tomado precauções de asepsia n'esta serie de manipulações, tanto o precipitado albuminoide como o seu soluto contaminaram-se com certeza repetidas vezes por numerosos germens da atmosphaera, dos filtros, etc.; apesar d'isso, a soluçãõ mantida a 37° oppoz-se ao desenvolvimento d'esses germens e destruiu ainda uma parte d'aquelles que n'ella se semearam. BITTER conclue das suas experiencias que a soluçãõ do «sôro precipitado» não actua tam energicamente sobre a bacteridea carbunculosa e o bacillo typhico como o sôro normal.

Os trabalhos de EMMERICH, Tsuboi, STEINMETZ e Löw (1892) lançam tambem alguma luz sobre a funcção exercida pelos albuminoides na actividade microbica do sôro. Eis como estes investigadores procederam:

Submetteram o sôro activo, contido n'um tubo de pergaminho, á dialyse na agua; no fim de 12 a 18 horas, a perda dos saes determinou a deposição dos albuminoides, deposito que, depois de tratado pelo alcool, foi reunido n'um filtro e o alcool removido por absorpção em papel poroso; seccaram emfim o precipitado no vacuo a 36° e dissolveram-no n'um soluto fraco de chloreto de sodio. Todas as operações correram sob a mais rigorosa asepsia, tendo-se esterilizado previa-

mente o tubo de pergaminho, o papel de filtro, vasos, etc.

Semeando na solução do albuminoide uma parcella de cultura microbiana, o numero de microbios, contado immediatamente depois e passadas 3 a 4 horas, é sensivelmente igual; pelo contrario, levando a 100° a solução e deixando-a arrefecer antes de fazer a sementeira, o numero de bacterias no fim de 4 horas torna-se 400 vezes maior. Se á solução adicionarmos uma pequena quantidade de hydrato de potassa ou se dissolvermos directamente o precipitado albuminoide n'um soluto de hydrato de potassa a 0,05 %, o liquido manifesta uma acção microbicida tam energica como o proprio sôro; aquecendo-o a 65° ou acidificando-o ligeiramente, transforma-se n'um excellente meio de cultura.

D'estas experiencias e das mencionadas a proposito da influencia da alcalinidade do sôro sobre o seu poder antiseptico, EMMERICH concluiu que a substancia bactericida é um componente alcalino da sôro-albumina; o calor e os acidos destruiriam a combinação do alcali com a molecula albuminoide e, portanto, a actividade do sôro; a addição de pequenas quantidades de hydrato de potassa reconstituiria, pelo menos em parte, o edificio molecular primitivo, regenerando, assim, o poder microbicida do sôro.

EMMERICH, não desconhecendo as razões que levaram BUCHNER a admittir que toda a sôro-albumina é activa, julga porém mais provavel



que só uma pequena parte da albumina do sôro exerce uma acção bactericida; esta parte proviria da albumina dos alimentos que, depois de absorvida e transformada pelas cellulas lymphaticas, seria dissolvida pelo sôro.

HANKIN (1892), na sua theoria dos alexocytos, pretende que a substancia bactericida do sôro é segregada pelos leucocytos eosinophilos de EHRLICH; mas, além da sua opinião não se apoiar em factos convincentes, para a rejeitar bastará considerar-se que o sôro d'alguns animaes em que não existem cellulas eosinophilas é, entretanto, bactericida. De resto, a theoria de HANKIN, como muitas outras, sobre a immuniidade e a resistencia dos animaes ás bacterias, não reclamam n'este logar a nossa attenção, por n'ellas não se especificar a substancia que confere ao sôro as suas propriedades microbicidas.

\*

\* \*

BUCHNER, n'uma experiencia já citada (pag. 42 n.º 11) verificou que a digestão do sôro pela pepsina não alterava as suas propriedades microbicidas; porém, a conclusão geral que tirou do seu trabalho foi que a sôro-albumina constituia a substancia bactericida do sôro. Ha evidente-

mente uma contradição flagrante entre o resultado d'aquella experiencia e a opinião final de BUCHNER: a digestão pepsica transforma a albumina do sôro em peptonas, isto é, em substancias altamente favoraveis ao desenvolvimento das bacterias; como é, pois, que constituindo a sôro-albumina a substancia activa do sôro, a sua transformação em peptonas não influe nas propriedades microbicidas do meio?

BUCHNER reconheceu previamente que a pepsina empregada digerira activamente a albumina do ovo e, portanto, nenhuma causa d'erros podia invalidar o resultado da experiencia; d'esta maneira, temos necessariamente de admittir que não é a sôro-albumina, como pretende BUCHNER, que se deve attribuir a acção microbicida do sôro. Mas, resistindo a substancia bactericida á digestão pela pepsina e, por outra parte, indicando as demais experiencias (aquecimento do sôro, dialyse, precipitação pelo alcool, etc.) a sua natureza poteica, devemos acreditar que ella entra no grupo das nucleinas.

Mal se comprehende como um investigador tam habil e tam auctorizado como BUCHNER podesse cahir n'uma contradição tam palpavel; impressionado por este facto, VAUGHAN, depois de deduzir *a priori* que a substancia bactericida do sôro só podia ser verosimilmente uma nucleina, tratou de esclarecer o problema por meio da experimentação.

A primeira questão a resolver consistia em

verificar se no sôro existem nucleinas. Pelo processo que adiante indicaremos, VAUGHAN (1893) conseguiu isolar do sôro de coelho e de cão uma substancia dotada de propriedades chimicas idênticas ás das nucleinas; mais tarde, LILIENFELD (1895) demonstrou igualmente a presença no sôro d'um acido nucleínico.

Em segundo lugar, tornava-se necessario averiguar se a nucleina isolada possuia uma acção bactericida. Para isso, VAUGHAN, depois de dissolver a nucleina n'uma solução ligeiramente alcalina, de volume igual ao do sôro que a havia fornecido, determinou a energia bactericida do liquido pelo methodo das placas. Eis algumas das suas experiencias:

*Nucleina dissolvida na agua esterilizada contendo 0,12 % de hydrato de potassa e 0,6 % de chloreto de sodio.*

#### A. VIBRIÃO CHOLERICO

	Tempo: Immediat. depois	5 min.	15 m.	30 m.	1 h.	1 1/2 h.	22 h.
N.º de colonias	2100	43	54	71	90	115	1200

#### B. STAPHYLOCOCCO PYOG. AUR.

	Tempo: Immediat. depois	1 h.	4 h.	7 h.	24 h.
N.º de colonias	4000	1720	1050	810	0

A experiencia A. mostra que a pequena percentagem de hydrato de potassa e de chloreto de sodio não impede o desenvolvimento do vibrião

da cholera; na experiencia B. a destruição total dos cocos no fim de 24 horas não póde attribuir-se aos mesmos elementos mineraes porque se verificára previamente que o staphylococco persiste vivo por alguns dias no soluto de potassa e chloreto de sodio.

*Nucleina dissolvida na agua esterilizada contendo 0,12 % de hydrato de potassa, 0,6 % de chloreto de sodio e 0,1 % de bi-carbonato e de phosphato de sodio.*

A<sub>1</sub>. VIBRIÃO CHOLERICO

	Tempo: Immediat. depois	1 h.	4 h.	7 h.	24 h.
N.º de colonias	350	105	150	42	0

B<sub>1</sub>. STAPHYLOC. PYOG. AUR.

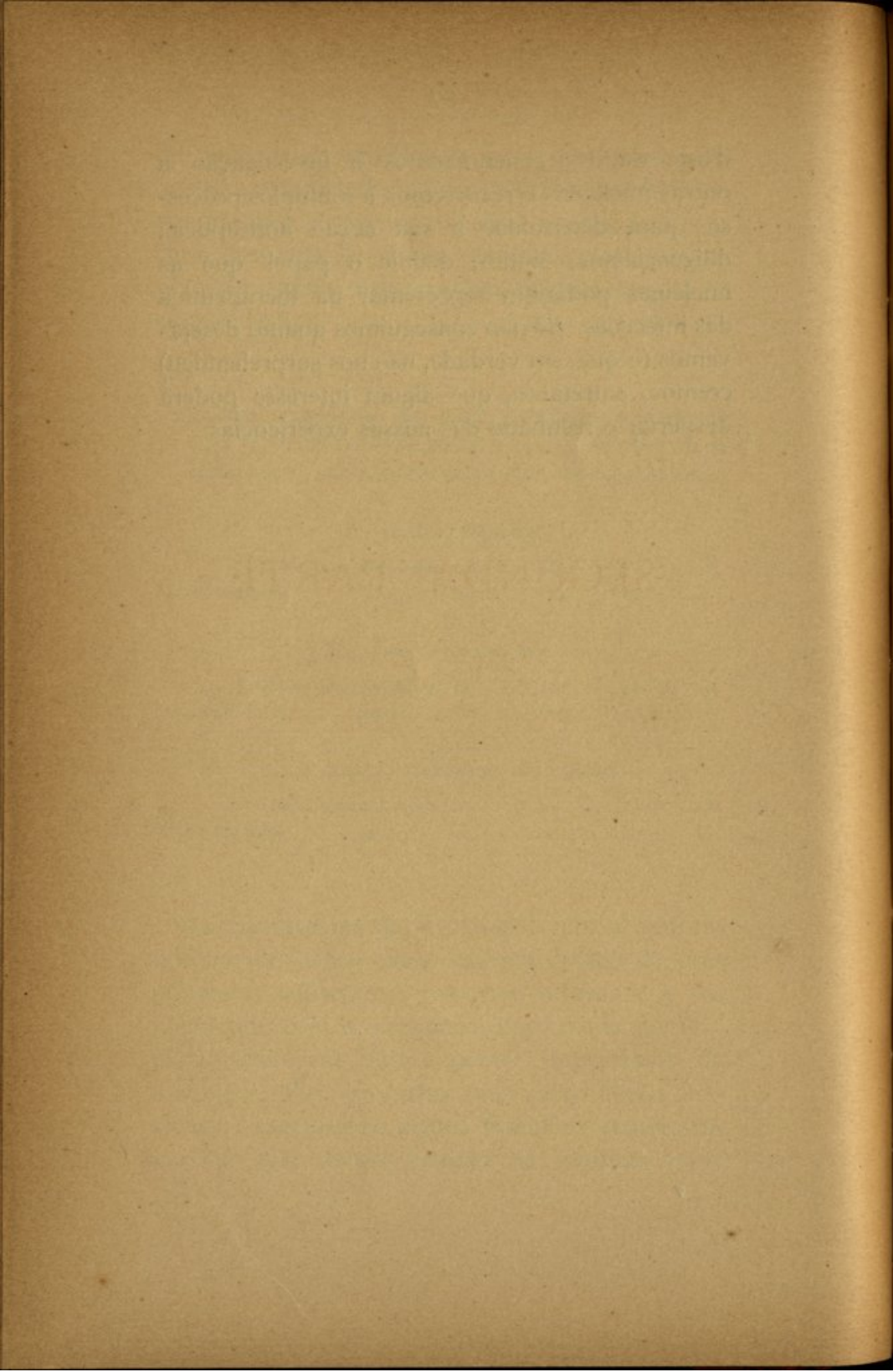
	Tempo: Immediat. depois	1 h.	4 h.	7 h.	24 h.
N.º de colonias	5000	250	1600	1200	0

C<sub>1</sub>. BACILLO DO CARBUNCULO SEM ESPOROS

	Tempo: Immediat. depois	1 h.	5 h.	19 h.	24 h.
N.º de colonias	430	0	0	0	0

As experiencias de VAUGHAN levam a admittir que no sôro existe uma nucleina dotada de propriedades antisepticas mas não affirmam a sua identidade com a substancia bactericida do sôro nem esclarecem outros pontos importantes do assumpto. Para preencher uma parte d'estas deficiencias executámos alguns trabalhos experimentaes de que damos relação na segunda parte

d'este estudo; generalizámos a investigação a outras nucleinas e recorremos a multiplos processos para determinar a sua acção antiseptica; diligenciámos, emfim, definir o papel que as nucleinas poderiam representar na therapeutica das infecções. Se não conseguimos quanto desejavamos (o que, em verdade, não nos surprehendeu) cremos, entretanto, que algum interesse poderá despertar o resultado das nossas experiencias.



SEGUNDA PARTE

SECONDA PARTE



## SEGUNDA PARTE

### I

#### Origem, composição, preparação e propriedades das nucleinas

*Origem das nucleinas.* — As nucleinas (paranucleinas d'alguns auctores) constituem um grupo de proteides de funcção acida, insolueis na agua, nos acidos diluidos e no alcool, soluveis nos alcalis, muito ricos em phosphoro e indigestiveis ou difficilmente decompostos pelo succo gastrico. Tratadas a quente pelos alcalis ou pelos acidos não muito concentrados, as nucleinas transformam-se parcialmente em substancias ainda mais phosphoradas — os acidos nucleinicos ou nucleicos; estes, precipitam a albumina e as albumoses, formando nucleoalbuminas. Pela digestão artificial, as nucleoalbuminas desdobram-se em nucleinas e em diversos albuminoides (geralmente globulinas) que, no estado de peptonas, ficam dissolvidos no liquido digestivo.

As nucleinas encontram-se em todas as cellulas animaes e vegetaes, constituindo os elementos

essenciaes do nucleo; entram em percentagem muito menor na composição do protoplasma. Para alguns auctores (O. HERTWIG, etc.) os nucleolos verdadeiros são formados exclusivamente de nucleinas emquanto que as nucleoalbuminas acham-se representadas por toda a porção chromatica dos nucleos; para outros (KÖSSEL, LILIENFELD, etc.) a parte fundamental dos nucleos como do cytoplasma consiste n'uma combinação d'acidos nucleinicos, em proporção maior ou menor, com principios albuminoides não phosphorados. N'esta ultima hypothese, a importancia physiologica dos elementos constitutivos do nucleo e do cytoplasma, dependeria da percentagem em acido nucleinico das nucleoalbuminas d'esses elementos; assim, em ordem decrescente do valor funcional, da acidez e da riqueza em phosphoro, classificar-se-iam a *chromatina*, a *plastina*, a *linina*, a *pyrenina* e emfim as *nucleoalbuminas* do protoplasma, substancias que, sob o ponto de vista morphologico, corresponderiam respectivamente á *chromatina*, aos nucleolos, ás partes achromaticas (e figuradas) do nucleo e ás porções figuradas do cytoplasma. As restantes materias phosphoradas do nucleo e do protoplasma (lecithinas, cholesterina, etc.) devem considerar-se extranhas á molecula d'albumina (DANILEVESKY); é por ellas que o cytoplasma, contendo apenas  $\frac{1}{2}$  a 1% de phosphoro nas suas nucleoalbuminas, póde entretanto apresentar-se accidentalmente mais phosphorado que o proprio nucleo. A differença d'acidez das nucleoalbuminas

explicaria ainda a electividade dos corantes para cada um dos elementos da cellula.

Deixando, porém, todas estas questões ainda não resolvidas, o que não oferece duvida é a preponderancia do papel physiologico desempenhado pelas nucleinas e que O. HERTWIG exprime por estas palavras: «*eu considero a nucleina e a paranucleina como as substancias essenciaes do nucleo, sobre as quaes assentam em primeiro logar as funcções physiologicas d'este orgão*».

As nucleinas constituem, pois, a substancia fundamental dos elementos organizados; formam as partes essenciaes dos nucleos, isto é, dos organitos que, segundo as idéas reinantes, dominam senão concentram todas as manifestações vitaes da cellula; é no segmento fecundante do espermatozoide, em que a energia da vida assume proporções incalculaveis, mysteriosas, que se encontra o acido nucleinico quasi puro!

Qual a origem das nucleinas dos nossos tecidos?

As nucleinas entram na composição de todos os elementos animaes e vegetaes; como, além d'isso, existem no leite (1) que, durante mezes, é o nosso alimento exclusivo, poderá presumir-se que ellas penetram no organismo pelo aparelho digestivo. A hypothese da origem alimentar das nucleinas está, entretanto, em desaccordo com alguns factos que vamos referir.

(1) A percentagem de nucleinas no leite é muito pequena; no queijo é proximamente de 0,2 %.

Dissemos que as nucleinas resistem á digestão pelo succo gastrico; esta propriedade, que é um dos caracteres mais notaveis do grupo das nucleinas, simplifica singularmente a sua preparação (1). As experiencias de HOPPE-SEYLER mostram egualmente que o succo pancreatico não digere melhor as nucleinas; por outra parte, nos dejectos d'alguns animaes (do cão, por ex.) têm-se encontrado aquellas substancias em quantidade consideravel.

Estas razões, na falta d'uma analyse quantitativa das nucleinas ingeridas com os alimentos e das excretadas nos dejectos, analyse que resolveria directamente o problema da sua absorpção, estas razões, diziamos, favorecem mais a hypothese de que ellas se formam por synthese no organismo;

(1) O modo como as nucleinas se comportam perante o succo gastrico não é apreciado da mesma maneira por todos os chimicos: — GARNIER e SCHLAGDENHAUFFEN consideram-nas como «*completamente refractarias* á acção do succo gastrico»; — A. GAUTIER diz apenas que são indigestiveis; — para BUNGE «*não são atacadas senão difficilmente pelo succo gastrico*»; — LAMBLING diz: «*O succo gastrico não ataca senão difficilmente as nucleinas. A de levadura não é dissolvida pela pepsina chlorhydrica senão depois de 12 horas (KÖSSEL). A que deriva da caseina não é sensivelmente atacada mesmo no fim d'algumas semanas*»; etc. As nucleinas que preparámos pelo processo da digestão artificial, resistiram admiravelmente ao soluto pepsico: a nuclealbumina d'ovo esteve 20 dias a digerir e, que não houve decomposição sensivel da nucleina prova-o não só a quantidade obtida, a qual concorda com a percentagem indicada por MIESCHER, como a ausencia d'albuminoides na solução, verificada por diversos reagentes (ferrocyaneto de potassio acetico, acetato de cobre e reacção do *biureto*); a nucleina de sôro ficou menos tempo sob a acção do soluto digestivo mas, ainda n'este caso, levámos a digestão até ao desaparecimento completo dos albuminoides no liquido pepsico.

no mesmo sentido falla uma observação, muito interessante e frequentemente citada, devida a MIESCHER.

Nã epocha da ovulação, os salmões deixam o mar e sobem as correntes dos rios; a migração prolonga-se, pelo menos no Rheno, de quatro a quatorze mezes. Em todo este tempo, os salmões não ingerem nenhum alimento, como se deduz de se encontrar regularmente vazio o seu intestino; mas, o ovario, que antes da partida apenas figura com 0,4% do peso total do animal, augmenta depois extraordinariamente, elevando-se a percentagem a 19 e a 27%. O crescimento do ovario, não podendo operar-se por meio da alimentação, tem necessariamente de fazer-se á custa dos materiaes accumulados no organismo e, especialmente, nos musculos que formam a massa principal do corpo; ora, MIESCHER, por observações comparadas em salmões cuja columna vertebral era d'egual comprimento, demonstrou que, á medida que o ovario ganhava em peso, a massa muscular ia successivamente diminuindo, e que só a perda de albuminoides do musculo grande do tronco compensava e até excedia o augmento adquirido pelo ovario. Os ovos, porêm, contêm uma quantidade enorme de nucleina e de lecithina emquanto que nos musculos apenas existe uma diminuta porção d'estas substancias, embora n'elles se encontre muito acido phosphorico sob outra fórmula; o desenvolvimento do ovario á custa do musculo não consiste, portanto, n'uma simples transposição

de substancias d'uns para outros orgãos mas, conclue MIESCHER, resulta de transformações químicas profundas pelas quaes os albuminoides, as gorduras e os phosphatos dos musculos dão origem ás combinações características do ovo.

Nos organismos inferiores, nos seres monocelulares, as nucleinas formam-se evidentemente por synthese. As leveduras contêm uma quantidade relativamente grande de nucleinas e, entretanto, desenvolvem-se e multiplicam-se em proporções prodigiosas nos liquidos isentos de substancias albuminoides. Outro tanto diremos das bacterias e, entre ellas, dos bacillos diptherico, tetanico, choleric, typhico, etc., que pódem cultivar-se no liquido de USCHINSKY, liquido em que não entram materias proteicas (1); e, mais para notar é que as toxinas produzidas n'este meio possuem a mesma *virulencia* que as formadas no caldo ordinario. Algumas toxinas, como a tuberculina purificada por BRIEGER, pela sua composição centesimal, pertencem certamente ao grupo das nucleinas (A. GAUTIER); ora, FRAENKEL e, depois d'elle, diversos investigadores (KÜHNE, PROSKAUER, WESBROOK)

(1) A composição do liquido de USCHINSKY é a seguinte :

Agua . . . . .	1000 partes
Glycerina . . . . .	30-40 "
Chloreto de sodio . . . . .	5-7 "
Chloreto de calcio . . . . .	0,1 parte
Sulphato de magnesio . . . . .	0,2-0,4 "
Phosphato de potassio . . . . .	2-2,5 partes
Lactato de ammonio . . . . .	6-7 "
Asparaginato de sodio . . . . .	3,4 "

isolaram a tuberculina e tambem a malleina de culturas em meios livres de substancias proteicas.

Admittindo que as nucleinas dos alimentos atravessam intactas o aparelho digestivo do homem e dos animaes superiores, como explicar a sua formação por synthese nas cellulas do organismo?

Para perscrutar o mechanismo d'um phenomeno intimo da nutrição, tam complexo como o presente, teremos d'invadir os dominios da hypothese. Os acidos nucleinicos, tratados a quente pelos acidos mineraes diluidos, desdobram-se em acido phosphorico e em bases azotadas crystallisaveis — a *adenina* e a *guanina*; a adenina, por oxydação, dá a *hypoxanthina* e, a guanina, transforma-se em *xanthina* (1). A xanthina e a hypoxanthina são productos de desassimilação da familia do acido urico. Apoiados n'estes factos, tracemos os delineamentos geraes da theoria. O acido phosphorico, combinando-se no organismo com as bases azotadas, produz uma substancia acida — o acido nucleinico; pela união do acido nucleinico a pequenas quantidades d'albumina forma-se a nucleina; a nucleina, ligando-se a outros albuminoides, constitue as nuclealbuminas e, estas, aggregando novas materias phosphoradas, gorduras,

(1) A simples inspeção das formulas mostra como se faz esta oxydação.

{Adenina . . . . .  $C^5H^4Az^4, Az H$   
 {Hypoxanthina . . .  $C^5H^4Az^4, O$

{Guanina . . . . .  $C^5H^4Az^4O, Az H$   
 {Xanthina . . . . .  $C^6H^4Az^4O, O$

saes, etc., representarão todos os elementos fundamentais do nucleo e do protoplasma (DELAGE).

*Composição das nucleinas.* — A composição centesimal das nucleinas melhor estudadas, indicada por diversos auctores, é a seguinte:

	C.	H.	Az.	Ph.	S.
Nucleína de levedura (KOSSEL)...	40,8	5,4	16,0	6,2	0,38
Nucleína de liquido seminal de salmão (MIESCHER).	36,1	5,1	13,1	9,6	—
Nucleína de gemma d'ovo (BUNGE) (1)	42,11	6,08	14,73	5,19	0,55
Nucleína de substancia cerebral (MIESCHER). . . . .	50,5	7,8	13,2	2,1	—
Nucleína de leite (LUBAVINE). . . . .	48,5	7,1	13,2	4,6	—
Tuberculina (BRIEGER) . . . . .	47,02-48,1	7,06-7,55	14,45-14,73	4,3	1,14-1,17

*Preparação da nucleína de sôro.* — Na preparação da nucleína de sôro seguimos o processo

(1) O ferro do vitello acha-se combinado a esta nucleína (0,29 de Fe. %) e, portanto, d'ella deriva a hemoglobina formada durante o periodo d'incubação do ovo; por esta razão, BUNGE denominou-a *hematogeneo*, nome por que se designa geralmente.



descripto minuciosamente por VAUGHAN e NOVY nos seguintes termos :

«Escolhem-se animaes saudaveis que não tenham servido em experiencias anteriores. Fixa-se solidamente o animal n'um apparelho de contenção e põe-se a descoberto a carotida com todas as precauções antisepticas. Faz-se a laqueação da arteria na sua extremidade terminal e, afastada cerca de duas pollegadas para a extremidade central, applica-se uma pequena pinça. Fende-se então a arteria com um bistori e introduz-se uma pequena canula de vidro a que se adapta um tubo de cautchu que communica com um frasco de ERLÉNMYER; a canula fixa-se á arteria por meio d'uma ligadura; o bistori, a canula, o tubo e o frasco são previamente esterilizados. Retira-se depois a pinça e o sangue corre para o frasco. Sangra-se o animal até á morte. Rodeia-se de gelo o frasco que contém o sangue e deixa-se a repouisar durante 24 horas; no fim d'este tempo, o sôro acha-se separado. Passa-se o sôro para um frasco esterilizado e addiciona-se-lhe cerca de 10 vezes o seu volume d'uma mistura d'alcool e d'ether em partes eguaes; produz-se assim um volumoso precipitado, quasi branco. Deixa-se ficar o precipitado, pelo menos durante 24 horas, tendo o cuidado de remover duas ou mais vezes por decantação o alcool e o ether, substituindo-os por egual volume da mistura alcooleo-etherea. Decanta-se então o fluido que sobrenada, addiciona-se um egual volume de solução d'acido chlo-

rhydrico a 0,2% contendo pepsina activa, colloca-se o frasco na estufa a 38° e leva-se a digestão até que o fluido não dê mais a reacção do *biureto* para peptonas. De cada vez que se verifica esta reacção, decanta-se o liquido da porção não digerida e substitue-se por igual volume de nova solução digestiva. Para maior segurança de que a digestão seja completa, póde deixar-se o frasco na estufa por alguns dias. A digestão effectua-se com rapidez e, depois de proseguir até um certo ponto, cessa totalmente. A pequena parte não digerida apresenta uma côr acinzentada. Lança-se n'um filtro esterilizado e lava-se primeiro com uma solução d'acido chlorhydrico a 0,2 % e depois com alcool; em seguida deixa-se o filtro exposto ao ar durante meia hora ou mais tempo a fim de que todo o alcool desapareça por filtração ou evaporação».

O processo de preparação da nucleína, tal como fica transcripto, apresenta algumas particularidades, inteiramente dispensaveis, que o tornam longo e dispendioso. A precipitação dos albuminoides por uma mistura d'alcool e d'ether de volume *dez vezes* superior ao do sôro; a substituição d'esta mistura, *pelo menos duas vezes*, nas 24 horas seguintes; emfim, a renovação do soluto digestivo até que não accuse *a presença de peptonas*, constituem evidentemente precauções exageradas que sómente se justificam por VAUGHAN realizar as suas experiencias n'uma epocha em que se desco-

nhacia a existencia de nucleinas no sôro; como, porêm, um dos fins que visavamos era precisamente a verificação d'aquellas experiencias, não podiamos deixar de cumprir as rigorosas indicações do auctor.

Desconhecendo a percentagem de nucleina dissolvida no sangue, fizemos um ensaio previo com 25 c. c. de sôro de coelho. O precipitado albuminoide, depois da digestão pela pepsina, ficou reduzido a uma ligeira nubecula que a menor agitação diffundia por todo o liquido; para separal-o, recorreremos á filtração por papel mas, a parte não digerida era realmente em tam pequena quantidade que não conseguimos destacad-a das paredes do filtro.

Reconhecemos assim a necessidade de operar com maiores massas de sôro, para o que nos dirigimos a um animal mais corpulento.

D'uma cabra, pesando proxivamente 15 kilogrammas, retirámos 1130 grammas de sangue; depois da retracção do coagulo, recolhemos 330 c. c. de sôro. A 300 c. c. de sôro adicionámos 3 litros de mistura alcooleo-etherea, mistura que se renovou duas vezes nas 24 horas seguintes; o precipitado, livre d'alcool e d'ether por filtração e evaporação consecutiva, foi posto a digerir á temperatura de 29° no soluto d'acido chlorhydrico a 2‰ contendo um grammma de pepsina. Passados 5 dias, durante os quaes se fez por 5 vezes a decantação do soluto digestivo e a sua substituição por outro semelhante, verificámos que a digestão

tinha terminado e, além d'isso, que já não existiam peptonas no liquido; procedemos então á lavagem no filtro da parte não digerida, primeiro com o soluto d'acido chlorhydrico a 0,2 % e depois com o alcool a 95°. A substancia assim isolada, pesava, ainda humida d'alcool, 10 centigrammas.

*Preparação da nucleina de gemma d'ovo.* — A nucleina d'ovo póde preparar-se rapidamente por diversos processos, mencionados nos tratados de chimica biologica; preferimos, porém, recorrer ainda n'este caso á digestão pela pepsina para não nos afastarmos do caminho seguido na preparação da nucleina de sôro. Eis como procedemos:

100 gemmas d'ovos, pesando 1650 grammas, depois de uma forte batedura com algumas gottas d'acido acetico, foram tratadas successivamente pelo ether (5 litros d'ether durante 48 horas), pelo alcool a 95° (5 litros d'alcool durante 48 horas), pelo alcool a 85° á temperatura de 50° durante meia hora e lançadas immediatamente n'um filtro de malhas largas; a massa das gemmas, livre por esta fórma de gordura, lecithina, cholesterina, protagon e pigmentos, foi posta a digerir em 6 litros de soluto d'acido chlorhydrico a 3 % contendo 6 grammas de pepsina. Prolongámos a digestão por 20 dias e renovámos o soluto digestivo até ao desaparecimento completo das peptonas (reacção do *biureto*); dissolvemos em seguida o residuo da digestão no hydrato de

potassa a 5 ‰ e precipitámo-lo de novo pelo alcohol e acido chlorhydrico. A nucleina obtida devia pesar approximadamente 16 grammas.

*Preparação da nucleina de levadura de cerveja.*

— Empregámos uma levadura alcoolica, cremos que constituida exclusiva ou principalmente pela especie *Saccharomyces cerevisiae* (1). A levadura (2250 grammas), depois de lavagem pela agua e decantação, foi tratada pelo acido chlorhydrico a 5 ‰ a que se addicionou, passados alguns minutos, soda caustica em ligeiro excesso; filtrámos logo em seguida e recolhemos o liquido n'um soluto fraco d'acido chlorhydrico; separámos por decantação o pequeno precipitado que se formou e lavámo-lo no filtro successivamente com acido chlorhydrico diluido, agua e alcohol a 60° de temperatura. A nucleina, depois de secca, pesava 15 decigrammas.

*Preparação da nucleina de tecido nervoso.* —

Tentámos preparar esta nucleina, seguindo o processo mais geralmente recommendado; vimos, porém, com surpresa falhar a nossa tentativa n'uma operação que se nos afigurava muito facil. A substancia encephalica de boi (1555 grammas), privada das meninges e lavada repetidas vezes em agua para dar sahida a todo o sangue, foi

(1) Levadura vendida pela casa Springer & C.<sup>a</sup>, de Paris.

tratada successivamente pelo ether (3 litros durante 48 horas), pelo alcool a frio (3 litros durante 48 horas), pelo alcool a quente e pela agua fervente; submettemos em seguida o resto da polpa á digestão pepsica e, logo que esta terminou, lançamos o residuo n'um soluto de soda caustica a 2 % para dissolver a nucleina. Restava sómente filtrar e precipitar a nucleina; não conseguimos, porém, levar a effeito esta filtração, por mais diligencias que para isso empregassemos. O liquido, que constituia uma especie de emulsão, não atravessava o papel de filtro nem, sob pressão, a véla CHAMBERLAND; com filtros de malhas mais largas, como o algodão em rama e o panno, passava levando em suspensão todas as particulas insolueis.

*Preparação da nucleina dos elementos figurados do sangue.*— O stroma dos globulos rubros dos mammiferos é constituido por substancias do grupo das nuclealbuminas; nas hematias nucleadas, como as das aves, as nucleinas encontram-se n'uma percentagem muito mais elevada.

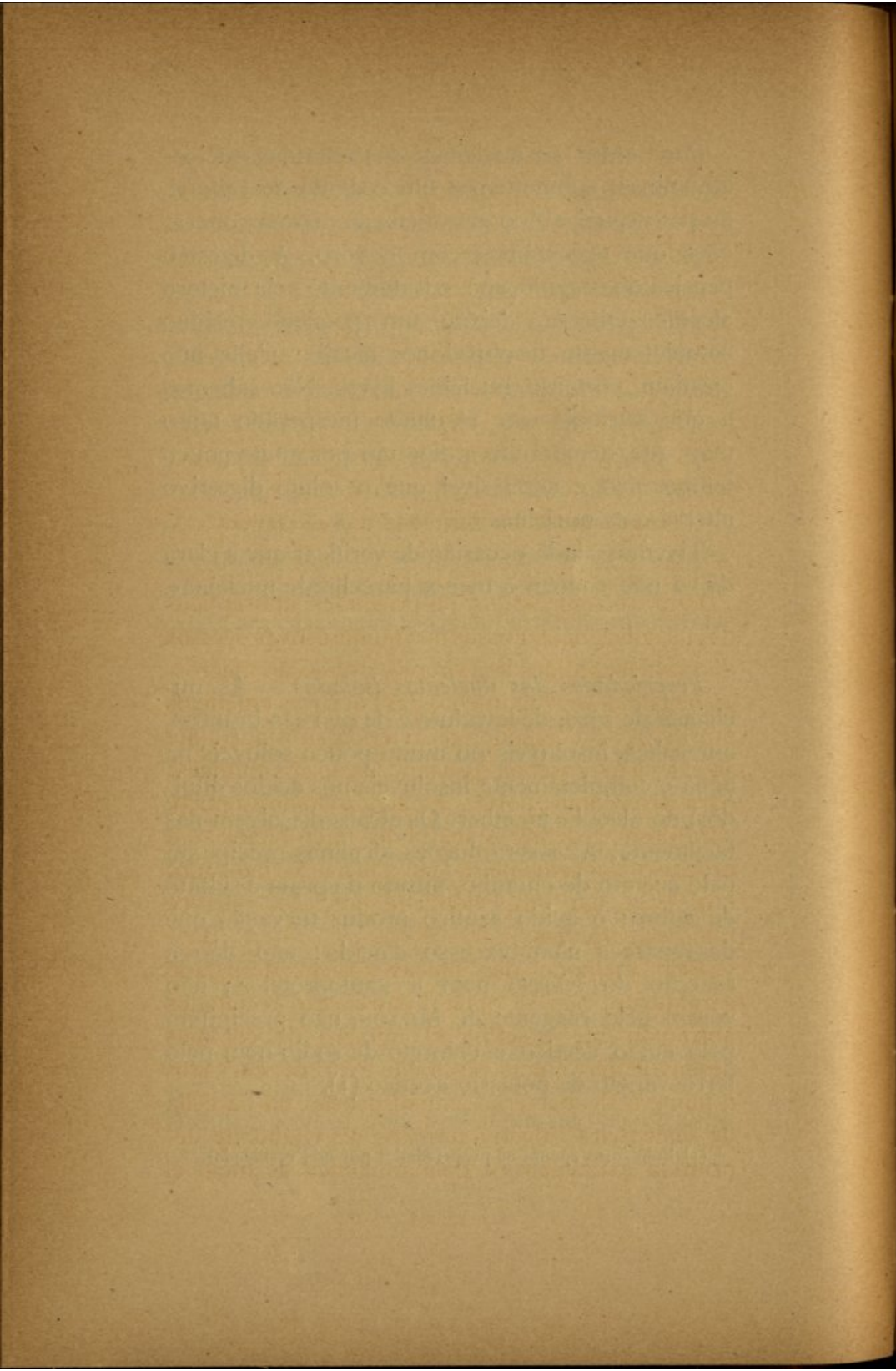
Na constituição dos globulos brancos entram as seguintes materias proteicas: uma nuclealbumina, a *substancia hyalina* de ROVIDA; algumas *cell-globulinas* de HALLIBURNTON, hoje consideradas como nuclealbuminas; a *nucleo-histone* de LILIENFELD, que se desdobra facilmente em nucleina e em histone; emfim, uma *cell-albumina*, identica ou muito semelhante á serina.

Para isolar as nucleinas das referidas nucleoalbuminas, submettemos um coagulo de sangue, de peso igual a 800 grammas, ás mesmas operações que executámos com o sôro. A digestão pepsica do coagulo, após o tratamento pela mistura alcooleo-etherea, deixou um pequeno residuo completamente insolúvel nos alcalis; n'elle não existiam, portanto, nucleinas livres. Não sabemos a que attribuir este resultado inesperado tanto mais que, demorando a digestão por muito pouco tempo, não é admissivel que o soluto digestivo alterasse as nucleinas.

Tivemos ainda occasião de verificar que a clara d'ovo não contém a menor parcella de nucleinas.

*Propriedades das nucleinas isoladas.* — As nucleinas de sôro, de leavadura e de ovo são brancas, amorphas, insolúveis ou muito pouco soluveis na agua e completamente insolúveis nos acidos diluidos, no alcool e no ether. Os alcalis dissolvem-nas facilmente. As suas soluções alcalinas precipitam pelo acetato de chumbo, nitrato de prata e sulfato de cobre; o acido azotico produz turvação que desaparece n'um excesso d'acido; não dão a reacção do *biureto* nem a xantoproteica; não córam pelo reagente de MILLON, não precipitam pelo acido acetico e chloreto de sodio nem pelo ferrocyaneto de potassio acetico (1).

(1) Indicámos apenas as propriedades por nós verificadas.





## II

### Propriedades bactericidas das nucleinas

Para reconhecer as propriedades antisepticas d'uma substancia, possuimos numerosos processos d'investigação, desde a simples inspecção macroscopica do desenvolvimento das bacterias em meios nutritivos addicionados da referida substancia até ao exame microscopico e á inoculação nos animaes; para determinar, porêm, a energia do antiseptico, para dosar e definir o seu poder microbida, é o processo da sementeira em placas, já indicado, que, pela sua simplicidade e precisão, offerece maiores garantias.

Pelo methodo das placas (assim designado geralmente) não se obtêm, entretanto, resultados absolutamente exactos. O numero de colonias desenvolvidas n'uma placa não exprime, em rigor, o numero de bacterias em suspensão na parcella de sementeira: alguns germens de vitalidade depressida extinguem-se pela mudança de meio e,

outros, reunidos em grupos mais ou menos numerosos, formam depois uma unica colonia. A quantidade de sementeira, embora represente uma fracção determinada da materia de cultura, não contém necessariamente uma egual fracção do numero total de microbios: nos liquidos de cultura, ainda depois de bem agitados, a repartição das bacterias nem sempre é uniforme em virtude da camada gelatinosa que por vezes as envolve e que se oppõe á sua separação. Emfim, quando se pretende apreciar o desenvolvimento d'uma cultura durante um certo tempo, ha necessidade de semear em intervallos regulares uma serie de placas; ora, é difficil senão impossivel empregar sempre quantidades eguaes de substancia d'inoculação.

Repetindo as sementeiras e calculando a media das colonias em germinação, o methodo das placas fornece indicações sufficientemente exactas, como se prova pela concordancia nos resultados das innumerables analyses quantitativas das bacterias do ar e da agua, executadas regularmente em todos os institutos de bacteriologia; e, se os resultados d'estas analyses, que devem exprimir o *numero total* de bacterias existentes n'um dado meio, são admittidos unanimemente pelos bacteriologistas, mal se comprehende que CHRISTMAS e outros auctores condemnem o mesmo processo, quando se inquire sómente do *numero relativo* de microbios em vegetação n'um liquido.

Não se julgue, pelo que acabámos de dizer, que desprezâmos os outros meios d'investigação:

nas experiencias que vamos relatar d'elles nos soccorremos, tanto quanto nol-o permittiam as circumstancias, deixando apenas de recorrer systematicamente ao exame microscopico porque, para bem apreciar e interpretar as alterações morphologicas das bacterias, é necessaria muitas vezes uma educação pratica que só pelo uso do instrumento durante alguns annos poderá adquirir-se.

Para comparar a acção bactericida das nucleinas de sôro, d'ovo e de levadura, empregámos um solvente commum :

Agua filtrada.....	100	partes
Hydrato de potassa....	0,12	»
Chloreto de sodio.....	0,6	»

Esterilizámos o soluto por ebullicão e dissolvemos a nucleina de sôro em 100 c. c. (ou seja proxivamente  $1 \times 2000$ ) e as nucleinas d'ovo e de levadura na proporção de, respectivamente,  $5 \text{‰}$  e  $3 \text{‰}$ .

Exp. IV.— Em 3 tubos d'ensaio, cada um com cerca de 5 c. c. de soluto de nucleina de sôro, inoculámos respectivamente o coli-bacillo, o bacillo d'EBERTH e o vibrião da cholera d'Hamburgo (PFEIFFER); procedemos de tempos a tempos á sementeira na gelatina em placas, agitando previamente o liquido e servindo-nos sempre da mesma ansa de platina para cada especie micro-

biana; nos intervallos das sementeiras, conservá-mos os tubos na estufa a 37° (1).

Eis o numero de colonias desenvolvidas a 20° e contadas 48 a 72 horas depois:

		Tempo:	Immediat. depois	20 m.	2 h.	24 h.
Numero de colonias	}	Coli-bacillo	230	24	0	0
		B. d'EBERTH	112	0	0	0
		V. cholera.	335	0	0	0

Exp. V—Repetimos a technica da experiencia anterior, operando com o soluto de nucleina d'ovo. Obtivemos o resultado seguinte:

		Tempo:	Immediat. depois	1/2 h.	1 1/2 h.	2 1/2 h.
Numero de colonias	}	Coli-bacillo	4060	126	0	21
		B. d'EBERTH	175	0	0	0

Exp. VI—N'esta experiencia, conduzida como as precedentes, empregámos o soluto de nucleina de levadura.

		Tempo:	Immediat. depois	1/2 h.	1 1/2 h.	2 h.
Numero de colonias	}	Coli-bacillo	650	120	0	0
		B. d'EBERTH	180	0	0	0

Analysemos o resultado d'estas experiencias. Em primeiro logar, poderá extranhar-se que o

(1) A cultura do vibrão da cholera, como outras de bacterias pathogeneas, que destinavamos a um estudo sobre a funcção antitoxinica do figado, foram-nos cedidas obsequiosamente pelo illustre director do Instituto Bacteriologico de Lisboa, o ex.<sup>mo</sup> sr. CAMARA PESTANA, a quem testemunhámos o nosso agradecimento.

numero de colonias das placas semeadas immediatamente depois da inoculação das bacterias nos solutos de nucleina variasse consideravelmente não só d'experiencia para experiencia mas tambem na mesma experiencia; note-se, porêm, que quando procedemos á sementeira dos solutos de nucleina, tomámos uma quantidade *arbitraria* de cultura, em geral a porção de liquido adherente a um fio ou pequena ansa de platina. Na experiencia V, em que mais avulta a differença do numero inicial de colonias, fizemos uma sementeira mais abundante de coli-bacillo (o conteúdo de 10 ansas de platina) para verificar se, augmentando o numero de microbios, a acção bactericida continuava a exercer-se. A materia d'inoculação, retirada dos solutos de nucleina, foi empregada, tanto quanto possivel, em quantidades sempre eguaes para cada serie de placas semeadas com o mesmo bacillo.

Das tres experiencias deduz-se immediatamente que as bacterias em contacto com os solutos de nucleina foram destruidas n'um periodo de tempo variavel, periodo maximo de 20 minutos a  $\frac{1}{2}$  hora para o bacillo typhico e o vibrião da cholera e, maior, para o coli-bacillo. A que attribuir a menor resistencia das duas primeiras especies? Acreditâmos que para aquella differença concorreu principal ou exclusivamente a fraca vitalidade dos bacillos d'EBERTH e de KOCH: servimo-nos de culturas antigas que, a par d'uma virulencia já bastante attenuada, como observâmos por inoculação intrapleural do bacillo typhico no coelho, vegetavam

lentamente e com pouco vigor nos meios nutritivos ordinarios.

Comparando a acção bactericida dos solutos nucleínicos verifica-se que o primeiro actuou com maior energia do que os restantes; se as suas propriedades microbicidas derivam das nucleínas, deve concluir-se que a de sôro, n'uma diluição 6 a 10 vezes maior que a d'ovo e a de levadura, possui entretanto um poder antiseptico superior.

Na experiencia V, com o coli-bacillo, depois d'uma placa isenta de germens, encontrámos na seguinte algumas colonias (21). A ausencia de colonias na placa semeada 1  $\frac{1}{2}$  hora depois da inoculação do soluto de nucleína deverá acceitar-se como indicando a extincção completa dos bacillos ou significará apenas que por uma circumstancia excepcional, fortuita, a parcella de sementeira não arrastou parte das bacterias que ainda existiam no liquido? Por outros termos: trata-se d'uma verdadeira repullulação, como se nota nas experiencias com o sôro (vej., por ex., pag. 64 e 73) ou d'uma das deficiencias, já enumeradas, do methodo das placas? Apesar do facto coincidir precisamente com o emprego d'uma quantidade maior de sementeira, optámos pela segunda interpretação porque, admittindo mesmo que toda a nucleína se desdobrasse em substancias proprias para a nutrição das bacterias, não era com tam pequena percentagem d'alimentos que se compensavam as qualidades do soluto de potassa, desfavoraveis á repullulação dos microbios.

Depois de reconhecer que os solutos nucleinicos exercem uma acção antiseptica notavel, impõe-se a necessidade de averiguar se aquella actividade resulta das nucleinas, se do seu solvente.

O solvente usado podia destruir as bacterias quer por privação d'alimentos quer pela acção da potassa e do chloreto de sodio.

A miseria nutritiva do meio, sufficiente para impedir a multiplicação dos germens, não bastava para matal-os com rapidez, tanto mais que operámos com especies que, infelizmente, vivem por muito tempo na agua, como mostram as experiencias de laboratorio e os ensinamentos da epidemiologia. O hydrato de potassa e o chloreto de sodio entravam no liquido em proporção muito diminuta para destruir em poucos minutos quasi todos os microbios. Emfim, sabiamos pelas experiencias de VAUGHAN que o vibrião da cholera, semeado em solutos de nucleina de sôro de cão e de coelho, contendo potassa (0,12 %) e sal marinho (0,6 %), soffria a principio uma forte redução seguida, mais tarde, de repullulação; o desenvolvimento secundario do bacillo, se tendia a demonstrar que a acção bactericida primeiro observada devia imputar-se ás nucleinas, fornecia a prova irrefutavel de que aquelles elementos mineraes eram destituídos de propriedades antisepticas apreciaveis. VAUGHAN affirmava ainda que «o staphylococco pyogeneo aureo conservava a sua vitalidade por alguns dias na agua contendo 0,5 % de hydrato de potassa».

Accumulavam-se, pois, as razões para considerar as nucleinas como os elementos activos dos solutos mencionados; mas, a resolução definitiva do problema dependia, em ultima instancia, da experimentação directa. Experimentámos apenas com o coli-bacillo: das bacterias que nos interessavam era aquella que, na verdade, pelas condições de vitalidade das culturas mais fielmente podia esclarecer-nos não só sobre os efeitos da mudança brusca de meio como sobre a acção microbicida propria do soluto de potassa.

Exp. VII.—Inoculámos o conteúdo d'algumas ansas de platina, d'uma cultura em caldo nutritivo ordinario de coli-bacillo, em 5 c. c. de soluto esterilizado de hydrato de potassa (0,12 %) e de chloreto de sodio (0,6 %); fizemos sementeiras na gelatina em placas, servindo-nos sempre da mesma ansa de platina; no intervallo das sementeiras, deixámos o soluto de potassa na estufa a 37°. Passadas 48 a 72 horas, contámos nas placas o numero seguinte de colonias:

Tempo:	Immediatamente depois	1 h.	5 h.	24 h.
N.º de colonias	750	160	142	0

N'esta experiencia, attribuímos a diminuição immediata dos microbios á mudança brusca de meio: apenas  $\frac{1}{5}$  dos germens conseguiu adaptar-se ás novas condições de vida. Depois d'esta queda



repentina do numero de bacillos nota-se um periodo estacionario em que, provavelmente, a multiplicação dos mais fortes ia compensando a falta dos que morriam por inanição ou pela acção da potassa e do sal marinho; persistindo as influencias nocivas ás bacterias, a sua vitalidade foi decrescendo successivamente para se extinguir por completo antes de 24 horas.

Pelos motivos já expostos, não esperavamos encontrar no soluto de potassa propriedades tam hostis ao coli-bacillo; e, se repetissemos a experiencia com as enfraquecidas culturas dos bacillos d'EBERTH e de KOCH, de certo que mais accentuados seriam os effeitos observados. O poder antiseptico das nucleinas não deve, portanto, identificar-se com o dos solutos das experiencias IV, V, e VI: os resultados obtidos são imputaveis em parte á transplantação das bacterias para um meio differente e á presença dos elementos mine-raes. Mas, não deverão aquelles resultados attribuir-se exclusivamente ao solvente das nucleinas? Não, evidentemente. Nas experiencias IV, V e VI operou-se a destruição total dos bacillos typhico e choleric *em menos de trinta minutos* e, do coli-bacillo, *em menos de noventa minutos* (duas vezes); na experiencia VII, o coli-bacillo ainda se conservava vivo *depois de cinco horas*.

Na experiencia seguinte, em que prescindimos do soluto de potassa, patenteia-se igualmente a acção antiseptica das nucleinas.

Exp. VIII — Alguns centigrammas de nucleina d'ovo, retirados d'um frasco com ether, foram lançados em dois tubos d'ensaio esterilizados; para a evaporação completa do ether, collocámos os tubos na estufa a 37° durante 3 dias; passámos a nucleina, depois de secca, para dois tubos — A e B — contendo caldo nutritivo ordinario; a nucleina formou deposito no fundo do liquido; o tubo C, com egual quantidade de caldo, serviu de testemunha.

No tubo A inoculámos o conteúdo d'uma ansa de platina de cultura em caldo de coli-bacillo; no tubo B inoculámos 3 ansas; no tubo C, uma ansa. Depois de 48 horas na estufa a 37°, o tubo C, testemunha, apresentava uma turvação manifesta enquanto que o caldo dos tubos A e B permanecia limpido acima do deposito de nucleina. Repetimos a inoculação nos tubos A e B, semeando no primeiro 4 e, no segundo 6 ansas da cultura primitiva: no fim de 2 dias não se manifestara ainda turvação sensivel. Addicionámos, então, ao tubo A 1 c. c. e ao tubo B 2 c. c. da cultura de coli-bacillo: no dia seguinte havia turvação em ambos os tubos.

A acção antiseptica revelada n'esta experiencia accentua-se consideravelmente se attendermos não só a que empregámos a nucleina que no soluto de potassa mostrou menor actividade como a que o caldo podia dissolver apenas uma quan-

tidade muito pequena da substancia; se accrescentarmos que o soluto de potassa, de per si, se oppõe ao desenvolvimento e destróe um grande numero de bacterias ao passo que o caldo convém admiravelmente á sua cultura, devemos concluir que a nucleina, n'este ultimo meio, actuou com maior energia do que no primeiro.

Como interpretar a maior actividade da nucleina no caldo?

A parte da nucleina dissolvida no caldo, em contacto com a cultura (bacterias e seus productos) inoculada, formou uma combinação albuminoide, uma nuclealbumina, dando lugar a que uma parcella da nucleina em deposito, dissolvendo-se, fosse substituída no liquido; a nova porção de nucleina dissolvida, transformando-se em nuclealbumina, provocou por sua vez a dissolução d'egual quantidade de nucleina precipitada; por esta deslocação incessante da substancia *de reserva*, as bacterias ficaram sob a acção permanente das moleculas de nucleina, com todas as suas affinidades livres. Emquanto a sementeira foi pequena, a reproducção das bacterias não fornecia principios albuminoides sufficientes para neutralizar a nucleina que a todo o momento se revezava no liquido; com a sementeira abundante, a producção de substancias neutralizantes excedia a de nucleina *activa* e a cultura desenvolveu-se. A quantidade de nucleina activa do caldo era, portanto, muito superior á de nucleina a principio dissolvida. Não passa d'uma hypothese a inter-

pretação que propomos, hypothese justificavel pelas propriedades chimicas das nucleinas.

Na primeira parte d'este estudo (pag. 46, 47, 60, etc.) vimos que alguns bacteriologistas, apoiados em experiencias realizadas com esporos do bacillo do carbunculô, contestavam a acção bactericida do sôro e dos humores do organismo; por esta circumstancia, a investigação da influencia das nucleinas sobre aquelle microorganismo, além de necessaria, despertava um interesse especial. Experimentámos primeiro com as nucleinas dissolvidas no soluto de potassa, empregando uma cultura antiga de *bacillus anthracis* em que existiam apenas esporos; pelo processo das placas, tentámos apreciar o numero de germens em suspensão no liquido sem que conseguissemos resultados verosimeis: a gelatina, ora apparecia crivada, ora completamente isenta de colonias, não sendo possivel estabelecer nenhuma relação entre o numero d'estas e o tempo de contacto dos esporos com as nucleinas.

Esta incoherencia nos resultados proviria exclusivamente das inferiores qualidades nutritivas da gelatina para a cultura da bacteridea (DENYS)? Dependeria ainda de circumstancias em que interviesses as nucleinas ou o soluto de potassa?

Se as experiencias que executámos não permitiam acompanhar as oscillações do numero de microbios no liquido, algumas affirmavam que

os esporos podiam ahi conservar-se vivos pelo menos durante algumas horas. Para melhor esclarecermos este ultimo ponto, recorreremos á inoculação em animaes.

Exp. IX — Em dois tubos — A e B — contendo 1 c. c. cada um de solução de nucleina d'ovo, lançámos respectivamente 3 gottas de cultura de *bacillus anthracis* (com esporos); no tubo C, contendo 1 c. c. de solução de potassa, semeámos 3 gottas da mesma cultura. Deixámos na estufa a 37° o tubo A durante meia hora e, os tubos B e C, durante duas horas; injectámos, em seguida, o liquido de cada um dos tubos no tecido cellular da parede abdominal de 3 cobayas. Em todas se desenvolveram as lesões proprias do carbunculo: a cobaya A morreu em 55 horas; a cobaya B, em 67 horas; a cobaya C, testemunha, em 57 horas.

A cobaya inoculada com a cultura que ficou por mais tempo sob a acção da nucleina sobreviveu ás outras algumas horas; para attenuar, porém, a significação que se poderia dar á maior sobrevida d'este animal, notemos que a cobaya testemunha morreu duas horas depois da injectada com o liquido do tubo A. Convem lembrar que a cobaya é muito sensivel á bacteridea de maneira que um numero relativamente pequeno de bacillos, introduzidos no tecido cellular subcutaneo, determina a morte quasi com a mesma rapidez que a

inoculação d'uma quantidade consideravel de cultura; portanto, do resultado da experiencia precedente não póde concluir-se que a nucleina não destruisse alguns esporos (ou bacillos que d'elles nascessem) mas unicamente que, depois de duas horas, no liquido persistiam microbios virulentos. Emfim, todas as cobayas morreram n'um periodo de tempo mais longo do que geralmente se observa; esta demora, podia resultar do pequeno numero de bacterias inoculadas, da atenuação da cultura primitiva ou da atenuação ulterior pelo soluto de potassa.

Nas experiencias com o bacillo da tuberculose recorreremos em primeiro logar ao methodo das placas; as colonias, porém, não chegaram a desenvolver-se, quer fosse pela dessecação da gelose quer pela reconhecida difficuldade em fazer germinar o bacillo n'este meio nutritivo. Não repetimos a sementeira, removendo estes obstaculos pela simples addição á gelose d'algumas gottas de glicerina, por ser muito demorada a cultura do bacillo; além de que, haviamo-nos soccorrido simultaneamente da inoculação em animaes.

Exp. X — Cobaya A — Inoculação na cavidade peritoneal de 2 c. c. d'uma mistura em partes eguaes de solução de nucleina d'ovo e de cultura em caldo de *bacillus tuberculosis*, mistura que collocámos previamente na estufa a 37° durante 40 minutos.

Cobaya B — Inoculação intraperitoneal de 2 c. c. de liquido identico ao precedente, tendo ficado na estufa a 37° durante 90 minutos.

Cobaya C — Inoculação intraperitoneal de 2 c. c. d'uma mistura em partes eguaes de soluto de potassa a 0,2 % e de cultura de *bacillus tuberculosis*, mistura que deixámos na estufa a 37° durante 90 minutos.

Empregámos uma cultura de tuberculose, de vegetação abundante (cultura de 50 dias, obtida por deposição á superficie do caldo de materia tuberculosa); antes de a addicionar aos solutos, agitámol-a repetidas vezes e com força para repartir os bacillos pelo liquido. 53 dias depois da inoculação, sacrificámos as cobayas (que haviam conservado sensivelmente o peso primitivo) e procedemos á autopsia.

Cobaya A — Dois pequenos tuberculos no epiploon, menores do que cabeças de alfinetes; ausencia de lesões nas visceras thoraco-abdominaes e no ponto de inoculação.

Cobaya B — Pequeno nodulo tuberculoso, de dimensões d'um grão d'arroz, na parede abdominal, ao nivel do ponto d'inoculação; não existiam vestigios de tuberculose nos orgãos das cavidades thoracica e abdominal.

Cobaya C (testemunha) — Nodulo tuberculoso na parede abdominal ao nivel do ponto d'inoculação; tuberculos pequenos no epiploon; tuberculos maiores, alguns do tamanho d'um grão de milho, disseminados pelo figado.

Continuou a affirmar-se n'esta experiencia o poder antiseptico das nucleinas. E' digno de notar-se que a cobaya inoculada com a cultura submettida á acção da nucleina durante 1 1/2 hora apenas apresentou um pequeno nodulo tuberculoso no tecido cellular da parede abdominal; os bacillos injectados em grande quantidade na cavidade peritoneal foram destruidos e absorvidos sem provocarem lesões especificas, nem mesmo os tuberculos *asepticos* que geralmente se produzem pela inoculação de materia tuberculosa esterilizada.

Podiamos referir outras experiencias que executámos com algumas bacterias saprophytas; julgâmol-o, porém, desnecessario desde que a sua significação em nada altera a das anteriores.

Demonstradas, como ficam, as propriedades bactericidas das nucleinas, procurámos determinar a sua acção sobre as toxinas microbianas; a necessidade e as vantagens d'este estudo, ressaltavam immediatamente das propriedades chemicas das nucleinas e mais evidentes se tornavam por TICHOMIROFF ter verificado que o acido nucleinico precipita e destroe as toxinas tetanica e diphterica mas não as do vibrião da cholera e do streptococco pyogeneo.

Em virtude de circumstancias accidentaes, apenas tentámos experimentar com a toxina do bacillo da tuberculose. Empregámos primeiro



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 immunidade, 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  $1 \times 10$ , 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 caracteristicas.

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 nucleína ou d'acido nucleinico, applicadas em injecção 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 nucleína d'ovo a  $1 \times 100$ ; 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 nucleina 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 microbica 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 microbicas 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 bactericida 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 bactericidas 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 chimicas 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 influa 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 cholericá, 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 immuidade 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.

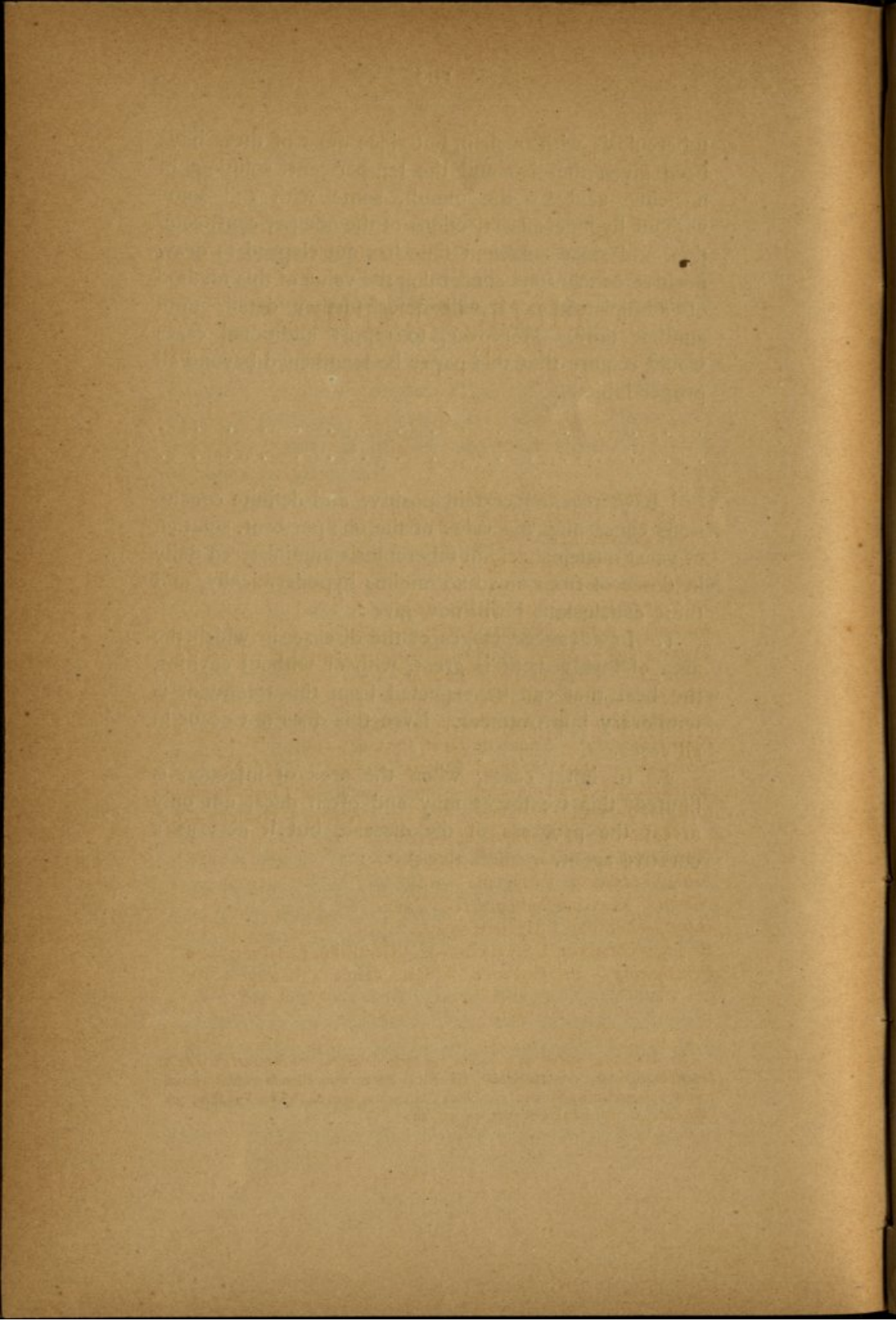
Since the first of January, 1896, I have treated between thirty and forty additional cases of pulmonary

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 <sup>(1)</sup>

- 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

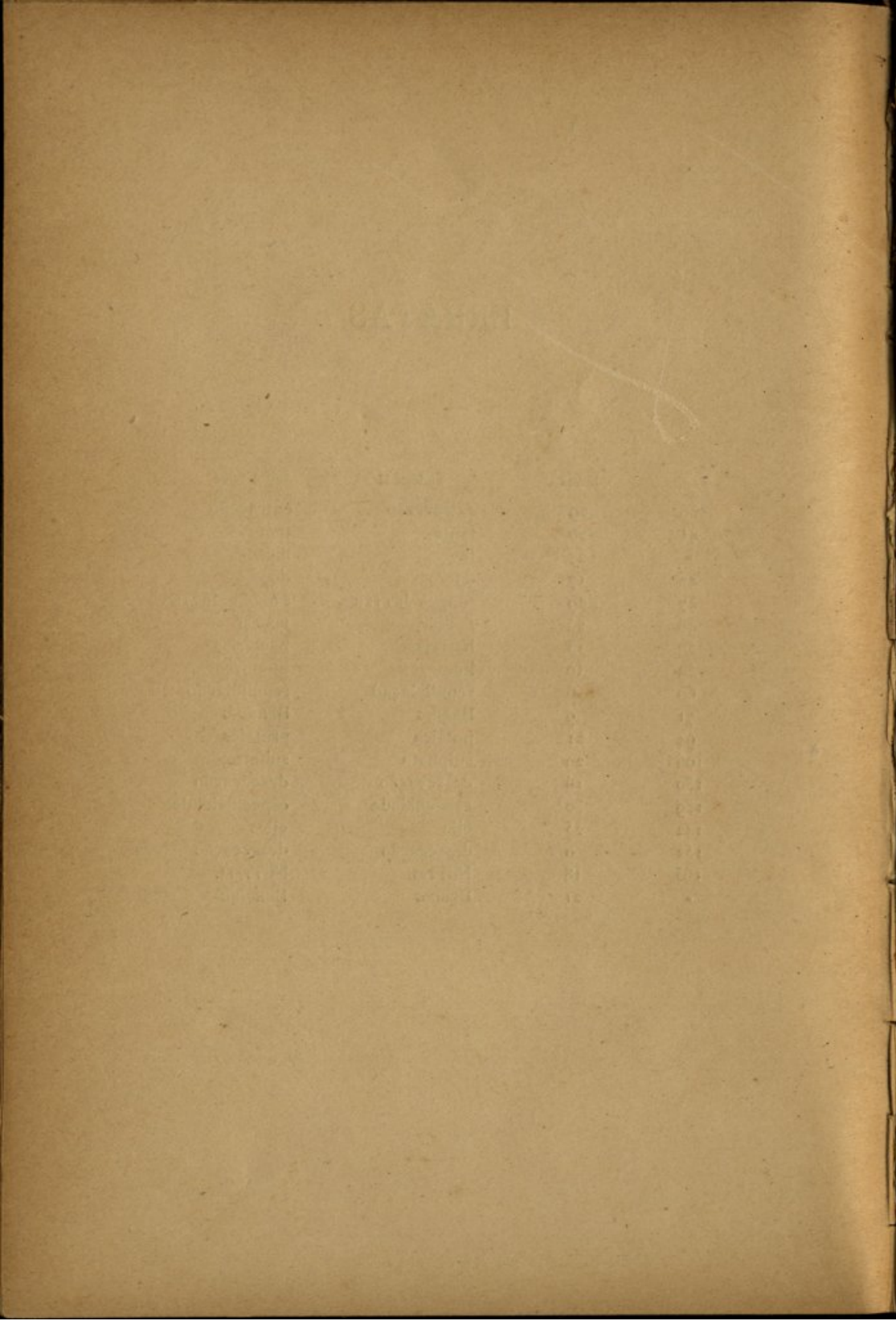
I — Origem, composição, preparação e propriedades das nucleinas . . . . .	101
II — Propriedades bactericidas das nucleinas . . . . .	117
III — Nucleinas e substancia bactericida do sôro . . . . .	139
IV — Tentativas d'immunisação e tratamento pelas nucleinas . . . . .	147
Additamento . . . . .	161
Bibliographia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

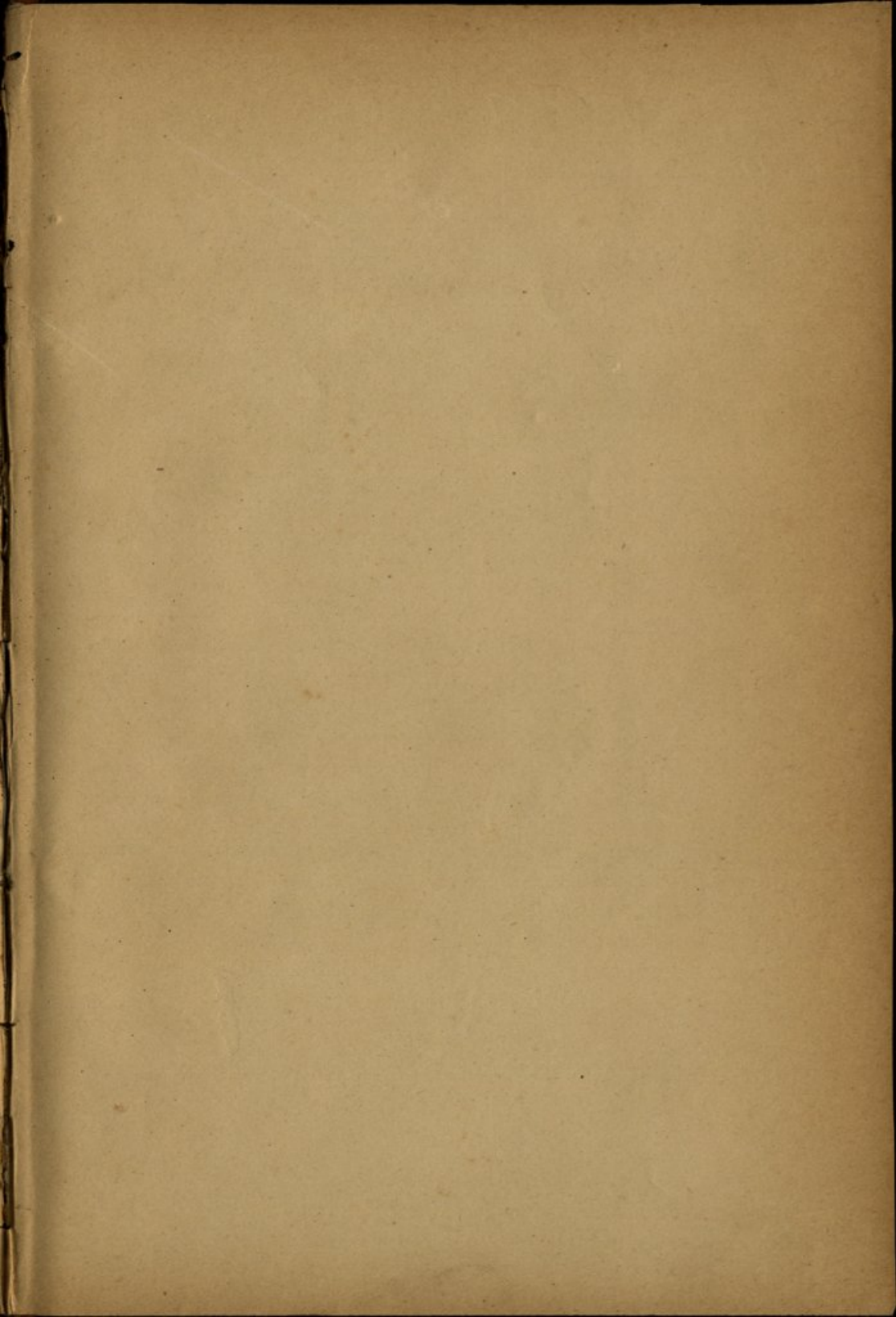
INDEX

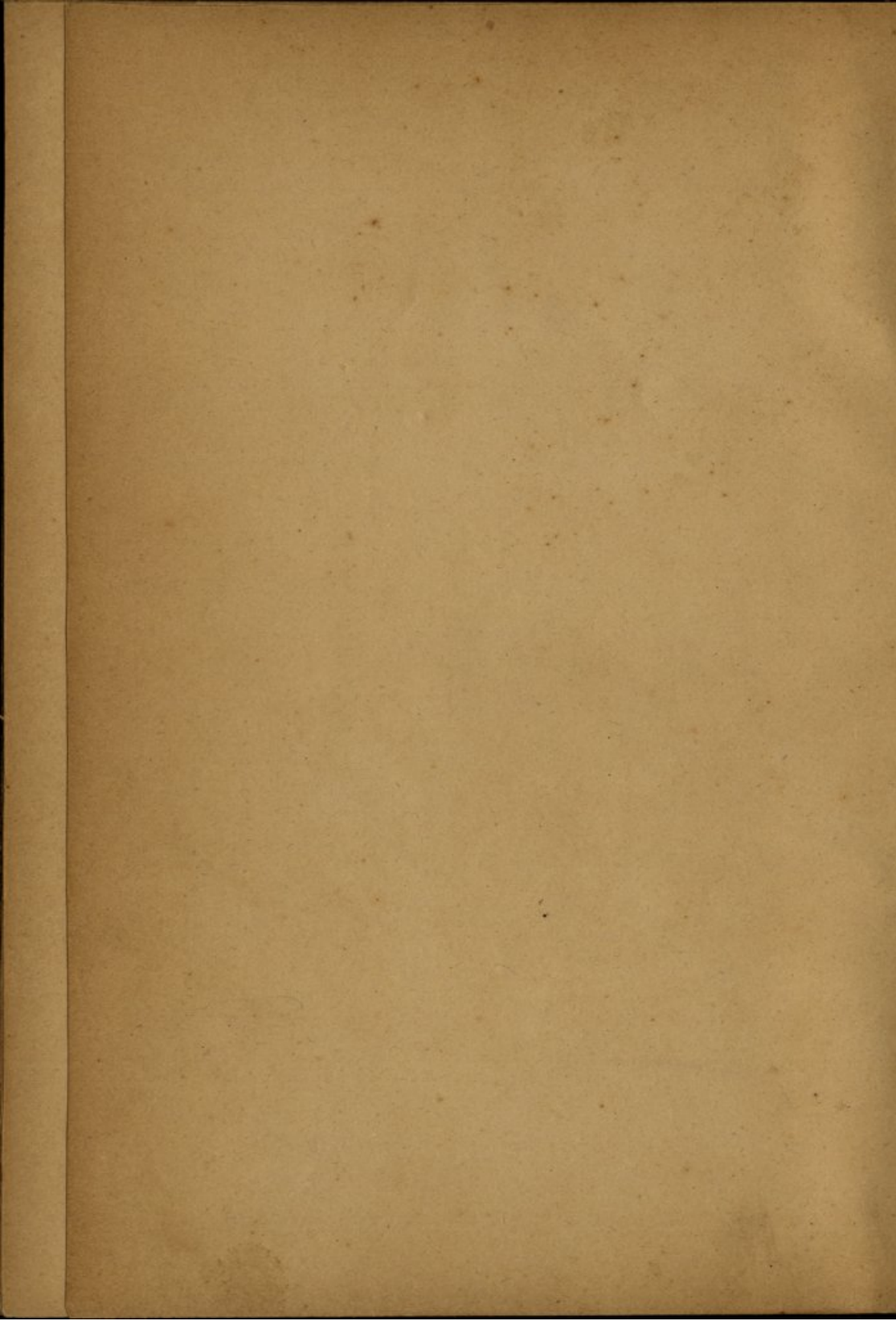
Faint, illegible text listing page numbers and titles, likely an index or table of contents.

## ERRATAS

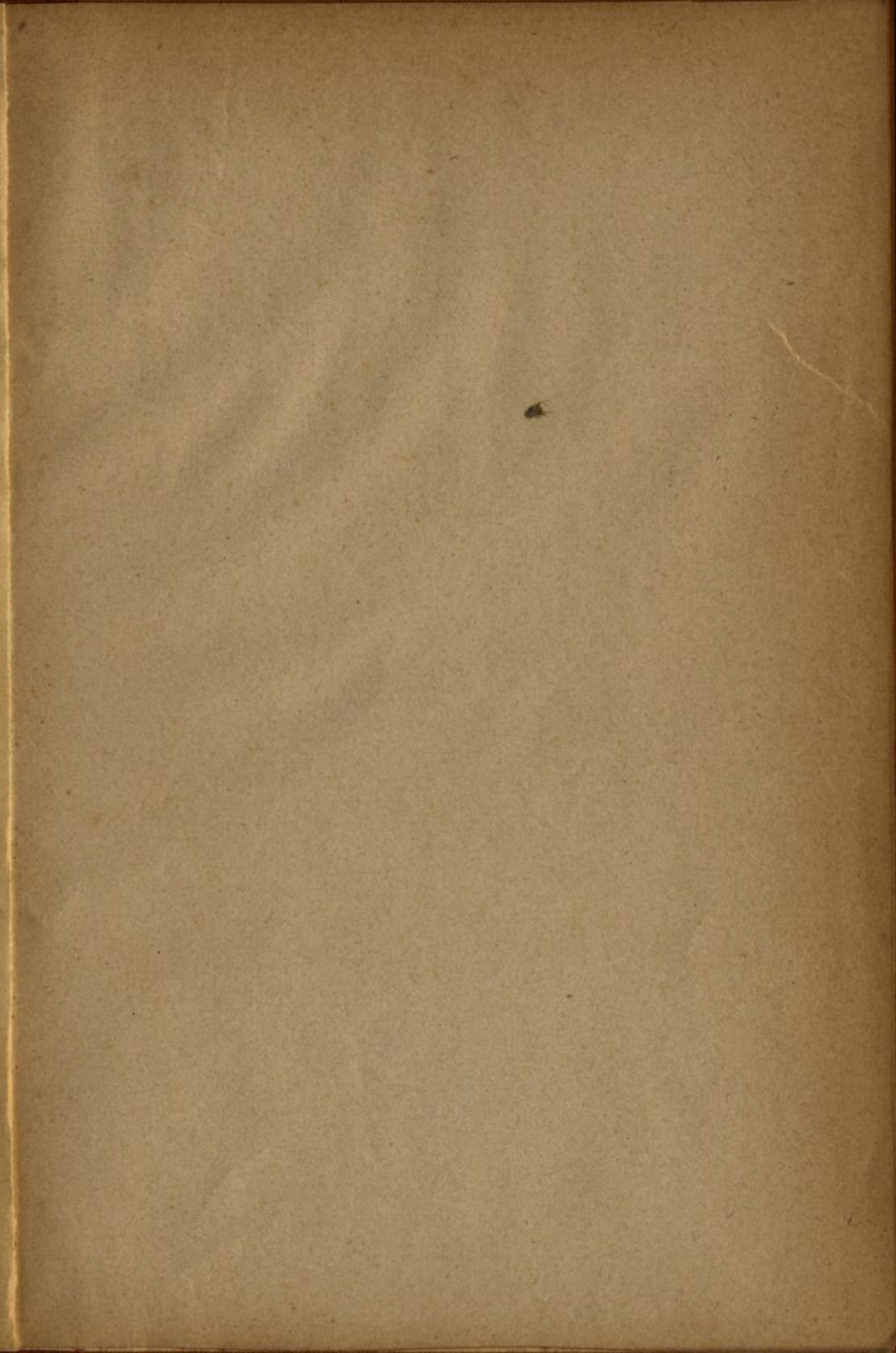
Pag.	linhas	onde se lê	leia-se
38	29	extravazão	extracção
41	20	tanta	tanto
»	27	lhe	lhes
42	17	de	do
47	29	sangue JETTER	sangue. JETTER
48	25	apezar	apesar
57	13	baterias	bacterias
59	10	homores	humores
60	6	repullalação	repullulação
71	9	BERING	BEHRING
94	21	poteica	proteica
106	29	sulphato	sulfato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











S  
C  
E  
T  
N

Sala  
Gab.  
Est.  
Tab.  
N.º

1977

W. CAMPOS -- DISSERÇÃO INAUGURAL -- MEDICINA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO