

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO

PUC – SP

Deisy Sunae Kawakami

As contribuições de Alexander Fleming para o estudo da

Imunologia Natural: 1908-1921

SÃO PAULO

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO

PUC – SP

Deisy Sunae Kawakami

**As contribuições de Alexander Fleming para o estudo da
Imunologia Natural: 1908-1921**

Mestrado em História da Ciência

Dissertação apresentada à
Banca Examinadora da Pontifícia
Universidade Católica de São Paulo,
como exigência parcial para obtenção
do título de Mestre em História da
Ciência, sob a orientação da Prof^a Dr^a
Lilian Al-Chueyr Pereira Martins.

SÃO PAULO

2009

BANCA EXAMINADORA

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Lilian Al-Chueyr Pereira Martins, orientadora deste trabalho, por me ajudar a descobrir o que fazer de melhor, por ser uma pessoa digna de total confiança e a quem pude recorrer quando tudo se mostrava difícil.

À Professora Doutora Maria Elice B. Prestes, pelo apoio oferecido, por ser a primeira pessoa a acreditar neste trabalho e pela generosidade de respeitar minhas escolhas.

Aos meus filhos, Fabio e Thais, por me incentivarem e muitas vezes compreender a atenção dispensada em função de minha dedicação a este trabalho.

Ao Fernando, pelo amor, respeito e pela compreensão nas horas em que estive ausente e pelo carinho nas horas presentes.

Ao meu colega de curso, Alcides Ferreira Goes, por estar sempre próximo nos momentos difíceis.

À secretaria de Estado de Educação de São Paulo pelo indispensável apoio financeiro.

RESUMO

Na virada do século XX, diversos cientistas estavam investigando as doenças infecciosas. O objetivo desta pesquisa é reconstruir o percurso seguido por Alexander Fleming (1881-1955) em seus estudos de microbiologia, desde 1908 até 1921, quando ele identificou a lisosima, uma enzima relacionada à imunologia natural dos seres vivos.

Essa dissertação contém uma introdução e cinco capítulos. O capítulo 1 trata do período em que Fleming iniciou suas investigações bacteriológicas ao lado de Wright, e o que prescreveu para o tratamento de infecções da pele. O capítulo 2 analisa as contribuições de Fleming relacionadas ao tratamento da sífilis, no que se refere à metodologia empregada na administração do Salvarsan. O capítulo 3 discute as pesquisas para o tratamento de feridas infectadas durante a Primeira Guerra Mundial, bem como, os experimentos realizados por Fleming para detectar os microrganismos presentes. O capítulo 4 descreve as pesquisas de Fleming em secreções e tecidos e a identificação de uma importante enzima relacionada à imunologia natural. O capítulo 5 apresenta algumas considerações finais sobre o assunto.

Esse estudo levou à conclusão de que Fleming era metódico sob o ponto de vista metodológico. Além disso, embora ele tivesse sido treinado por Almroth Wright, ao contrário de suas outras contribuições no período que resultaram de um trabalho coletivo, a lisosima foi uma contribuição original de Fleming. Esta contribuição foi significativa e modificou a visão que se tinha na época sobre o assunto.

Palavras-chave: História da Microbiologia; Fleming, Alexander; Wright, Almroth; Lisosima.

ABSTRACT

On the turn of the twentieth century, several scientists were investigating infectious diseases. The aim of this research is to rebuild the path followed by Alexander Fleming (1881-1955) in his studies on microbiology, from 1908 to 1921, when he identified an enzyme related to the natural immunology of living beings.

This dissertation contains an introduction and five chapters. Chapter 1 deals with Fleming's first bacteriological investigations, in cooperation with Almroth Wright (1861-1947). Besides that, it deals with Fleming's prescriptions for skin infections. Chapter 2 analyses Fleming's contributions concerning the SALVARSAN therapy. Chapter 3 presents Fleming's research on the treatment of infected injuries got during the First World War, as well as, the experiments on microorganisms performed by him. Chapter 4 describes Fleming's research on secretions and tissues, concerning the identification of an important enzyme related to the natural immunology. Chapter 5 provides some final remarks on the subject.

This study showed that Fleming was very cautious in methodological terms. It led to the conclusion that although Fleming had been trained under Wright and several of his contributions were part of a collective work, this was not the case concerning the identification of lysozyme. This Fleming's original contribution changes the view that was accepted at that time.

Key-words: History of microbiology; Fleming, Alexander; Wright, Almroth; Lysozyme.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| Introdução | 1 |
| Capítulo 1 - O tratamento de infecções da pele com vacina terapica | 7 |
| 1.1 - Metodologia de Wright | 7 |
| 1.2 - A pesquisa da <i>Acne vulgaris</i> | 9 |
| 1.3 - Algumas considerações..... | 13 |
| Capítulo 2 - As contribuições de Fleming para o tratamento da sífilis | 15 |
| 2.1 - Estudos sobre a sífilis | 15 |
| 2.1 - Teste de Wassermann | 16 |
| 2.3 - O tratamento da sífilis | 18 |
| 2.4 - Algumas considerações | 23 |
| Capítulo 3 - Estudos sobre as infecções em ferimentos | 24 |
| 3.1 - O tratamento de feridas | 24 |
| 3.2 - O período de guerra | 26 |
| 3.3 - Anti-sépticos utilizados durante a guerra | 31 |
| 3.4 - Estudos do <i>Influenzae</i> | 35 |
| 3.5 - Algumas considerações | 38 |
| Capítulo 4 - Fleming e os estudos sobre a lisosima..... | 39 |
| 4.1 - Retorno ao hospital <i>St. Mary</i> após a guerra..... | 39 |
| 4.2 - A imunologia natural de Élie Metchnikoff. | 40 |
| 4.3 - Os estudos de Fleming sobre a lisosima..... | 46 |
| 4.4 - Algumas considerações..... | 52 |
| Capítulo 5 - Considerações finais..... | 53 |
| Bibliografia | 55 |

INTRODUÇÃO

Esta pesquisa trata da História da Microbiologia no início do século XX e o tema são as contribuições de Alexander Fleming (1881-1955) para a imunologia natural, no período compreendido entre 1908 a 1921. Este período se iniciou com as investigações de Fleming sobre a *Acne vulgaris* até o descobrimento da Lisosima. Além disso, tratará também das contribuições de seu mestre, o pesquisador Edward Almroth Wright (1861-1947).

Apresentaremos nesta introdução um breve resumo da biografia dos pesquisadores acima mencionados, a metodologia terapêutica do período e os problemas encontrados nas trincheiras durante a Primeira Guerra Mundial.

Fleming nasceu em 06 de agosto em uma fazenda próxima a cidade de Darvel, planalto de Ayrshire – Escócia, filho do segundo casamento de Hugh Fleming com Grace Morton, passou os primeiros doze anos neste local¹.

Em 1893, com 13 anos, foi viver com o irmão mais velho, já formado em medicina, na cidade de Londres. Seu primeiro emprego foi aos 16 anos e durante quatro anos, foi funcionário da agência de navegação *American Line* situada no centro da cidade².

Em 1901, Fleming recebeu uma bolsa de estudos no Hospital Escola *St. Mary*, Paddington, graduando-se em 1906. Dois anos mais tarde recebeu os títulos de Bacharel em Ciência (B.S) e Membro da Ordem Britânica (M.B). Em 1909 completou seus exames para o *Royal College of Surgeons* da Inglaterra³.

Fleming foi admitido no Departamento de Inoculação do Hospital *St. Mary* em 1906 a convite de Wright, que nesse período era diretor do departamento. Tornou-se diretor assistente em 1921⁴.

No ano de 1909 ele aperfeiçoou o teste de Wassermann para detectar agentes sífilíticos, e em 1910 foi um dos pioneiros na utilização do Salvarsan 606 para tratamento da sífilis, sobre o que trataremos no capítulo dois⁵.

¹ Berveley Birch, *Alexander Fleming*, (Rio de Janeiro: Editora Globo,1990):14

² *Ibid.*,p.16.

³ Claude E. Dolman, “Alexander Fleming” In: Gillispie, Charlton Coulston (org), *Dictionary of Scientific Biography* (New York: Charles Scribner’s Sons, 1981), vol. III: 29.

⁴ *Ibid.*

Durante a Primeira Guerra Mundial (1914-1918) Fleming serviu no Corpo Médico das Forças Armadas com Wright no laboratório que pesquisava feridas de guerra, na cidade de Bolonha. Wright defendia o método de irrigação com solução hipertônica salina em feridas infectadas para promover a formação de fagócitos⁶, pois os anti-sépticos utilizados no período além de não alcançarem as regiões mais profundas dos ferimentos os destruíam⁷.

A Primeira Guerra Mundial teve início em agosto de 1914. Exércitos alemães vindos da Bélgica tiveram um encontro ostensivo com os exércitos aliados em 24 de agosto, emitindo ondas de choque através das capitais da Europa. Em setembro, entretanto, o avanço alemão parou com a batalha de Marne (subúrbio de Paris), exércitos alemães e franceses tentavam avançar, mas a parte da frente ocidental tinha se tornado razoavelmente fixa, confinada a trincheiras, que resistiu por quase quatro anos. Mais de 15.000 milhas de trincheiras foram construídas na forma de ziguezague do Mar do Norte até a Suíça. Para os soldados, a trincheira tornou-se uma incubadora para doenças bacterianas e outros incontáveis problemas, embora as tropas nessa guerra fossem melhores nos termos de saúde geral do que em guerras precedentes dentro da história. A guerra de trincheiras se caracterizou por suas próprias doenças e feridas de guerra. Além da febre de trincheira, tétano, feridas infecciosas, choque do escudo das barragens de artilharia, e o gás gangrena, havia uma taxa extraordinária de ulcerações nos pés causadas pelo frio⁸.

Após a Guerra Fleming, voltou para Londres para dar continuidade às suas pesquisas com microorganismos. Em 21 de novembro de 1921, observando uma placa de muco nasal, detectou um agente que dissolvia bactérias que nomeou de lisosima⁹.

Em 1928 observando uma placa de cultura com colônias de estafilococos, notou que o bolor do fungo *Penicillium notatum* as destruía. Comunicou em 1929 no *British Journal of Experimental Pathology* que a

⁵ Ronald Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of penicillin", *British Medical Journal* 27(1983):347-372, na p.354.

⁶ G. Sims Woodhead, "A discussion on phagocytosis and immunity", *The British Medical Journal* (1892):373-378, na p.373 - Célula que engloba e digere outras células ou qualquer material estranho a um organismo.

⁷ Dolman, "Alexander Fleming", p. 29.

⁸ John S. Haller. "Trench foot - A study in military - medical responsiveness in the great War, 1914-1918", *Medicine in Perspective*, 152(1990):729-733, na p.729-730.

⁹ Dolman, "Alexander Fleming", p. 29.

“penicilina” não interferia nas funções leucocitárias, não era tóxica a animais, e era muito eficiente como anti-séptico quando aplicada nas áreas infectadas. Por dificuldades em isolar a substância, ela só foi utilizada a partir de 1940 quando Ernest Chain (1906-1979), Howard Florey (1898-1968) e colaboradores em Oxford a estabilizaram e a purificaram¹⁰.

Fleming foi eleito membro da *Royal Society* em 1943 e recebeu o Prêmio Nobel de Medicina juntamente com Florey e Chain em 1945. Tornou-se diretor do Departamento de Inoculação do hospital *St. Mary* em 1946, após a aposentadoria de Wright¹¹.

Wright foi nomeado professor de patologia na Escola Médica do Exército em Netley – Inglaterra em 1892, ele exerceu esta função por dez anos. Destacou-se por desenvolver trabalhos com a coagulação do sangue e bacteriologia, bem como o desenvolvimento da vacina contra a febre tifóide. Essa vacina foi testada em soldados da Índia e Wright foi promovido a membro da Comissão Indiana de Pragas, posição que ocupou de 1898 a 1900. Entretanto, Wright teve alguns problemas quando estava trabalhando para o exército¹² que culminaram na sua demissão. Esse afastamento permitiu-lhe realizar seu importante trabalho como professor de patologia no Hospital *St Mary* em Londres (1902-1946)¹³.

Segundo Leonard Colebrook (1883-1967), Wright estava iniciando um novo capítulo na história da imunização, sendo inspirado por algumas conclusões de Louis Pasteur (1822-1895)¹⁴.

Em 1881, Pasteur e colaboradores faziam investigações sobre o antraz, doença que atingia rebanhos de carneiros. Eles perceberam que as culturas, em temperaturas mais altas que a normal provocava o crescimento de organismos enfraquecidos ou atenuados. Após a administração em carneiros saudáveis desses organismos, observou-se que não morriam por causa da doença, permaneceram vivos e imunes aos indivíduos doentes. Pasteur

¹⁰ Dolman, “Alexander Fleming”, p. 30.

¹¹ *Ibid.*, p.29.

¹² Leonard Colebrook, “Almroth Wright – Pioneer in immunology”. *British Medical Journal*, 2(1953):635-640, na p. 636. Dificuldades em obter provas estatísticas bem definidas, pois a inoculação da vacina teria sido realizada em apenas 4% dos soldados em serviço durante três anos.

¹³ Franklin Parker, “Wright, Almroth Edward”, In: Gillispie, Charlton Coulston (org), *Dictionary of Scientific Biography* (New York: Charles Scribner’s Sons, 1981), XIII: 511.

¹⁴ Colebrook, “Almroth Wright – Pioneer in Immunology”:637.

inaugurou uma nova metodologia contra as infecções bacterianas: as vacinas para estimular as defesas do organismo através da introdução de microrganismos enfraquecidos ou mortos¹⁵.

Wright estudou a fagocitose, pesquisa que havia sido iniciada pelo zoólogo russo Elie Metchnikoff (1845-1915), mas que era pouco conhecida e não havia nesse período métodos disponíveis para esse estudo¹⁶.

Metchnikoff, ao estudar em 1882 a origem de órgãos digestivos em larvas de estrela-do-mar, observou que certas células não relacionadas com a digestão envolviam e engoliam partículas de cor vermelha que haviam sido introduzidas no corpo das larvas. Chamou aquelas células de “fagócitos” (do grego “devorador de células) e ao processo de “fagocitose”¹⁷.

As publicações de Metchnikoff em 1884 sobre sua pesquisa da teoria fagocitária como sendo a primeira linha de defesa contra infecções na maioria dos animais, inclusive em seres humanos, e cujos fagócitos são um tipo de leucócitos, ou células brancas do sangue, receberam inicialmente uma reação mista, com alguns trabalhos dando apoio entusiástico para o novo conceito enquanto outros o criticaram ferozmente¹⁸.

Em 1888 Metchnikoff a convite de Pasteur, foi trabalhar no seu instituto de pesquisas onde permaneceu por 20 anos. Após a teoria fagocitária estar estabelecida e fundamentada, Metchnikoff retornou as pesquisas sobre imunidade em geral. Em 1905 publicou seu livro *Immunity in infective diseases*, descrevendo imunidade a doenças infecciosas do seguinte modo:

Imunidade contra doenças infecciosas deve ser entendida como um grupo de fenômenos em que um organismo é capaz de resistir ao ataque de microrganismos que produzem doenças. É impossível, nesse momento, dar uma definição mais precisa e é inútil insistir sobre ela. Alguns consideram necessário distinguir imunidade corretamente, como um estado permanente de

¹⁵ Alexander Fleming, “Louis Pasteur”, *British Medical Journal*, 4(1947):518-522, na p.519.

¹⁶ Colebrook, “Almroth Wright – Pioneer in Immunology”, p. 637.

¹⁷ James G. Hirsch, “Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff” *Bacteriological Review*, 23(1959):48-60, na p.48.

¹⁸ Woodhead, “A discussion on phagocytosis and immunity”, p.373.

refratários e “resistência” ou propriedade transitória de nos opormos à invasão de determinados microrganismos infecciosos. Não é possível manter esta distinção, na realidade, os limites entre estes dois grupos de fenômenos estão longe de ser constantes¹⁹.

Metchnikoff esclareceu sobre as formas de imunidade que um organismo poderia desenvolver:

A imunidade pode ser metabólica ou adquirida. A primeira sempre é natural, quer dizer, independe da intervenção direta da arte humana. Imunidade adquirida também é natural, pelo fato de que seja estabelecido como resultado da cura espontânea de uma doença infecciosa. Mas um grande número de casos de imunidade adquirida pode ser resultado da intervenção humana, como na prática da vacinação²⁰.

Os estudos de Metchnikoff formaram a base para um novo ramo da ciência médica microbiológica: a imunologia. Em 1908 recebeu o Prêmio Nobel referente às suas pesquisas sobre a imunidade²¹.

Nossa pesquisa focalizará os trabalhos e estudos de Wright e Fleming desenvolvidos após a publicação das pesquisas sobre a teoria fagocitária e imunologia natural de Metchnikoff até a descoberta da Lisosima, enzima com poder de matar e dissolver bactérias, distribuída largamente pelo corpo.

A escolha desse tema foi motivada pelo fato de não terem sido localizados até o momento muitos estudos sobre o assunto no período considerado. Não faremos menção ao estudo da penicilina, pois para isso

¹⁹ Elié Metchnikoff, *Immunity in infective diseases*. (London: Cambridge University Press, 1905):10.

²⁰ *Ibid.*

²¹ Hirsch, “Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff”, p.49.

demandaria muito tempo, fugindo aos limites previstos para uma dissertação de mestrado.

Um levantamento bibliográfico feito na *Critical Bibliography* da revista *Isis* mostrou que não há trabalhos publicados sobre a Lisosima, o que nos surpreendeu.

A linha adotada nessa pesquisa é História e Teoria da Ciência, e serão analisadas algumas publicações de Alexander Fleming e seu mestre Almroth Wright sobre imunologia natural correspondente ao período de 1908 a 1921.

A presente dissertação está dividida da seguinte forma: esta introdução, e quatro capítulos. O primeiro capítulo (“Tratamento de infecções da pele com vacina terapica”) apresentará um panorama dos estudos sobre vacina terapica de Wright e sua indicação no tratamento da acne, furunculoses e sicoses, como também as pesquisas desenvolvidas por Fleming sobre o assunto. O segundo capítulo (“As contribuições de Fleming para o tratamento da sífilis”) abordará os estudos de Fleming no aprimoramento do teste para detectar a sífilis em um organismo doente e a administração do composto denominado Salvarsan (606) para o tratamento. O terceiro capítulo (“Estudos sobre as infecções em ferimentos”) discutirá os métodos utilizados no período para combater as infecções em feridas, e os trabalhos de Wright e Fleming sobre a utilização de solução salina hipertônica para aumentar a produção de fagócitos nos ferimentos provocados por armas de fogo durante a Primeira Guerra Mundial. O quarto capítulo (“Alexander Fleming e os estudos sobre a Lisosima”) lidará com as pesquisas que realizou sobre uma enzima encontrada naturalmente nos tecidos vivos, capaz de dissolver e matar alguns microrganismos, bem como a discussão sobre as idéias de Metchnikoff, utilizadas no período para imunização natural. O quinto capítulo (Considerações finais) que tecerá alguns comentários sobre o que foi analisado nos capítulos anteriores.

CAPÍTULO 1

O TRATAMENTO DE INFECÇÕES DA PELE COM VACINA TERÁPICA

Este capítulo tratará do período em que Alexander Fleming (1881-1955) trabalhou com Almroth Edward Wright (1861-1947) no Departamento de Inoculação do Hospital *St. Mary*, onde desenvolveu suas investigações iniciais sobre bacteriologia.

1.1 A Metodologia de Wright

Em 1908, após se tornar membro da equipe médica do Hospital *St. Mary*, Fleming aplicou em seus pacientes a metodologia adotada por Wright, que consistia na imunização específica contra a infecção bacteriana já instalada. Nessa época, já se conheciam as vacinas, que estimulavam a produção de anticorpos através da introdução de bactérias atenuadas ou mortas para a prevenção de doenças, porém Wright defendia o tratamento da vacina terapica, que, ao invés de prevenir, utilizava injeções de bactérias mortas para tratamento de infecções²².

Wright já havia iniciado em Netley o estudo desse tratamento e para assegurar a dosagem correta das vacinas desenvolveu um teste chamado *Opsonic Index*, que se destinava a medir o teor de anticorpos no sangue dos organismos infectados. Essa medida foi necessária, pois uma grande dose de vacina poderia baixar o nível de anticorpos naquilo que foi chamada de “fase negativa”, de tal forma que o paciente poderia piorar e não ter resistência a qualquer generalização da infecção²³.

Segundo Wright, o método proposto por ele poderia ser considerado inexplorado e iria revolucionar a prática dos procedimentos utilizados nas invasões bacterianas localizadas, que consistiam em repetidas aplicações de

²² Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin": p.353.

²³ *Ibid.*

anti-sépticos ou, em casos em que eram impraticáveis essas aplicações, ocorria à retirada do membro infeccionado²⁴.

Em maio de 1903, Wright propôs um tratamento e os procedimentos para a aplicação da vacina terapêutica de estafilococos, após acompanhar pacientes em consultas que manifestavam infecções de pele. Esses estudos apresentavam curvas de aumento (fase positiva) ou diminuição (fase negativa) do poder fagocitário durante sua administração (ver fig. 1.1.1)²⁵.

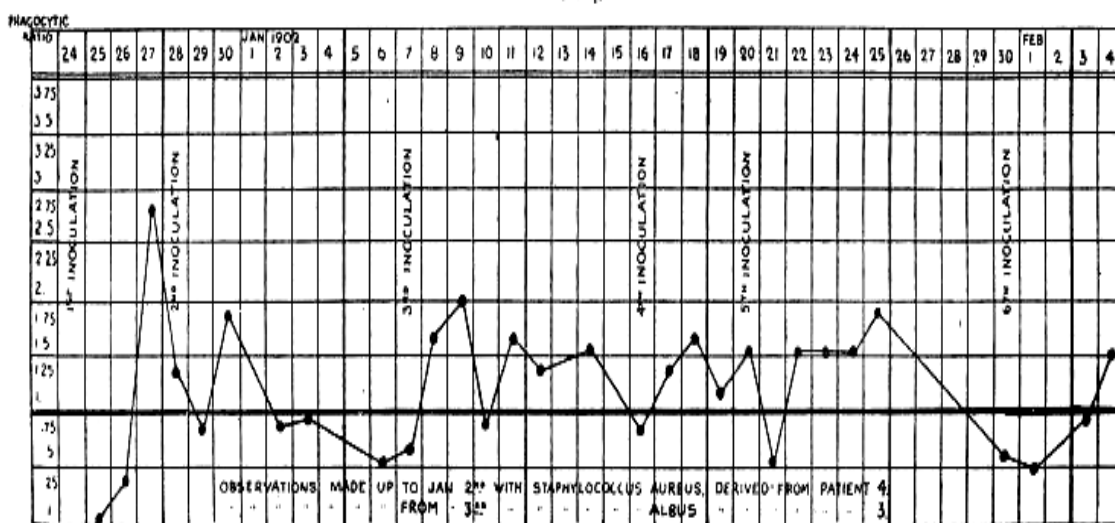


Fig.1.1.1 Curva da reação de imunização produzida a partir de uma série de inoculações de vacina de estafilococos. Wright, "The therapeutic inoculations of bacterial vaccines", *The British Medical Journal*, 1(1903):1070.

Wright indicava que havia em relação em cada processo de imunização, uma fase negativa e uma fase positiva quando a inoculação fosse bem sucedida e a manutenção da base imunitária. Doses excessivas da vacina envolveriam riscos, em particular, riscos que envolviam o prolongamento da fase negativa. O controle do número de inoculações deveria ser feito através de exames de sangue para ser evitado o prolongamento da fase negativa²⁶.

Neste artigo, Wright também propôs, após análise dos casos de encontrou em seus pacientes, um tratamento para furunculose, sicose, acne, e infecções localizadas na pele por estafilococos, a inoculação com a "vacina de estafilococos". Wright assim se expressou:

²⁴ Almroth Wright, "Therapeutic Inoculation of Bacterial Vaccines" *The British Medical Journal*, 1(1903):1069-1074, na p.1069.

²⁵ *Ibid.*

²⁶ *Ibid.*

Eu penso que não resta nenhuma dúvida que em *acne vulgaris*, furunculose, e na maioria dos casos de sicosose tenhamos que lidar com uma invasão dos folículos da pele, ou, conforme for, dos tecidos subcutâneos pelos *staphylococcus pyogenes*. Em quase todos os casos as áreas supuradas revelavam estafilococos em sua cultura. Este, entretanto, é apenas um dos fatores na causa dessas doenças.

Outro fator é revelado por uma investigação do poder fagocitário no sangue. O exame , em todos os casos com os quais já lidei, revelou um poder deficitário da fagocitose com respeito aos estafilococos.

Parece-me que nos casos estudados, nos percebemos uma relação com a cronicidade extrema, tendência à recaída, e não infectividade comparativa que caracteriza essas doenças, indicações claras da linha de tratamento que devem ser adotadas. Devemos primeiramente concentrar esforços na imunização de pacientes contra estafilococos²⁷.

Nesse artigo que escreveu sobre a vacina terapêutica, Wright defendeu o uso da aplicação argumentando que apesar da toxicidade das culturas de estafilococos, o tratamento envolveria um desconforto relativamente pequeno em relação ao sofrimento mental associado às deformações causadas pela acne ou sicosose, e aos danos físicos associados à repetitiva aplicação de anti-sépticos, depilação e a punção dos abscessos²⁸.

Em um artigo escrito por Wright em maio de 1904, para o *British Medical Journal* podemos encontrar a indicação para o tratamento da acne, furunculoses e sicososes, que consistia no uso da vacina de estafilococos. Justificou como a causa dos casos em que o poder fagocitário fosse baixo e

²⁷ Wright, "Therapeutic Inoculation of Bacterial Vaccines", p.1072.

²⁸ *Ibid.*

com apresentação de uma fase negativa duradoura, sem melhora dos pacientes, a concentração e o número elevada de doses das vacinas²⁹.

Wright trabalhava na pesquisa sobre imunização em seu laboratório, no Hospital *St. Mary*, quando os estudos preliminares sobre a fagocitose foram concluídos e estava pronto para iniciar seu plano de "imunização terapêutica", com seus assistentes Alexander Fleming, John Freeman (1880-1929) e outros, que tinham a tarefa de realizar os testes no sangue de pacientes tratados com a "vacina terapêutica"³⁰.

1.2 A pesquisa da *Acne Vulgaris*

Fleming, em abril de 1909, divulgou na Revista *The Lancet* um estudo sobre a causa da *Acne Vulgaris* e o tratamento com a vacina terapêutica³¹.

Nesse artigo, Fleming falou sobre a etiologia da *Acne vulgaris*, referindo-se a pesquisadores que trataram do assunto. Descreveu os estudos realizados e propôs um tratamento da doença por meio do bacilo específico ou em combinação com estafilococos³².

De acordo com Fleming, em 1893 o dermatologista Paul Gerson Unna (1850-1929), descreveu o bacilo que encontrou nas lesões da *Acne vulgaris*, o qual chamou de *Acne bacillus*. Embora não tivesse isolado o bacilo em cultura, o encontrara constantemente nos comedões³³ e nas pústulas. Levantou-se como hipótese com base histológica que o bacilo descrito por Unna era a causa provável não somente dos comedões, mas também das pústulas³⁴.

Outro dermatologista Raymund Sabouraud (1864-1938), em 1897, descreveu o bacilo como massa gordurosa que poderia ser encontrada na seborréia e também na *Alopecia areata* (perda repentina do cabelo do couro cabeludo ou do rosto). Considerou esta última uma condição da seborréia

²⁹ Almroth Wright, "On the treatment of acne, furunculosis, and sycosis by inoculations of staphylococcus vaccine", *British Medical Journal*, 1(1904):1075-1077, na p.1077

³⁰ Colebrook, "Almroth Wright – Pioneer in Immunology", p. 637.

³¹ Alexander Fleming, "On the etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines" *The Lancet*, 173(1909):1035-1038, na p.1035.

³² *Ibid.*, p.1037.

³³ Comedões são pequenos inchaços de cor de carne, brancos ou escuros que dão à pele uma textura áspera, encontrados na abertura de um folículo sebáceo. *MedlinePlus:Medical Encyclopedia dictionary*. Acesso em 26 de outubro de 2008.

³⁴ Fleming, "On the etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines", p.1035.

localizada. Ao que tudo indica foi o primeiro a descrever exatamente as propriedades culturais do micróbio, que nomeou dessa forma “*Bacilli de séborrhée grasse*”. Considerou que os nódulos endurecidos e a postulação da acne eram devido à infecção secundária sobreposta com estafilococos³⁵.

O zoólogo John D.F. Gilchrist (1866-1926), em 1899 e depois em 1903, indicou que esse bacilo, aparentemente idêntico ao descrito por Unna e Sabouraud, era o causador de todas as lesões da acne. Relatou que encontrara o bacilo em todas as manchas de pústulas da acne, e em aproximadamente 30 % dos casos obteve culturas puras nestas lesões. Ele deu nova denominação ao organismo “*Bacillus acne*”³⁶.

Em seus estudos Fleming utilizou material purulento extraído da pele. Inicialmente apareceu uma massa semi-fluida opaca constituída por pilhas de pus e depois de limpo e uma pressão adicional feita, uma massa gelatinosa representando como definiu “um comedão degenerado”³⁷.

Procedeu ao exame desse material motivado por duas razões: a primeira investigar a causa das pústulas, e a segunda, ocorrência de estafilococos e bacilos identificados nas películas das lesões através do método de Gram³⁸. Essa técnica permitiu a Fleming a separação de amostras bacterianas em gram-positivas e gram-negativas determinando a morfologia e o tamanho das amostras analisadas³⁹.

Fleming obteve a partir desse material 132 culturas. Em 13 delas ocorreu o desenvolvimento do bacilo da acne. Em 35 culturas não houve o desenvolvimento de nenhum bacilo. Em 40 culturas desenvolveu-se tanto o bacilo da acne como o estafilococo. Em 44 desenvolveu-se apenas o estafilococo. O grande número de culturas estéreis segundo Fleming devia-se ao fato do bacilo encontrar dificuldades em crescer em alguns dos meios utilizados⁴⁰.

³⁵ Fleming, “On the etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines”, p. 1035.

³⁶ *Ibid.*

³⁷ *Ibid.*

³⁸ O método de coloração de bactérias desenvolvido pelo médico dinamarquês Christian Gram (1853-1938) em 1884. Consiste no tratamento sucessivo de um esfregaço bacteriano, fixado pelo calor. www.dec.ufcg.edu.br/biografias. Acesso em 29 de maio de 2009.

³⁹ Fleming, “On the etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines”, p. 1036.

⁴⁰ *Ibid.*, p. 1037.

Fleming sugeriu que, dentre as culturas de estafilococos algumas haviam sido contaminadas acidentalmente. Ele alegou que havia encontrado dificuldades para esterilizar de modo eficiente a pele em alguns casos⁴¹.

O referido pesquisador apresentou neste artigo 10 argumentos favoráveis a presença do bacilo e a formação do pus:

1. Está constantemente presente no pus como mostrado pelo exame das películas.
2. É freqüentemente o único organismo presente no pus.
3. Pode freqüentemente ser recuperado do pus em cultura pura.
4. Inoculado na pele de um indivíduo suscetível, produziu uma foliculite pustular e o exame do pus não mostrou nenhum outro organismo presente.
5. Inoculado em animais produziu um abscesso na base da inoculação a partir da qual o bacilo foi recuperado na cultura pura.
6. O soro de pacientes afetados com acne aglutina o bacilo em alguns casos.
7. Os índices *opsonic* dos pacientes com *Acne bacillus* variam consideravelmente do normal.
8. Grande dose de uma vacina derivada do bacilo da acne tem, como veremos mais tarde, essa relação com o tratamento, induzido uma fase negativa caracterizada pela aparência das pústulas frescas das quais o bacilo foi recuperado na cultura pura.
9. Uma vacina deste organismo marcou o efeito benéfico nesta condição.
10. Quando um paciente tem um índice *opsonic* elevado para bacilo sua condição melhora, mas quando o índice *opsonic* é baixo, pústulas frescas aparecem⁴².

Tabelas como as de Wrigth, que indicavam a fase positiva e negativa do tratamento foram utilizadas por Fleming (ver fig.1.2.1) durante o período em que administrava as vacinas com bactérias específicas.

⁴¹ Fleming, "On the etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines", p. 1037.

⁴² *Ibid.*

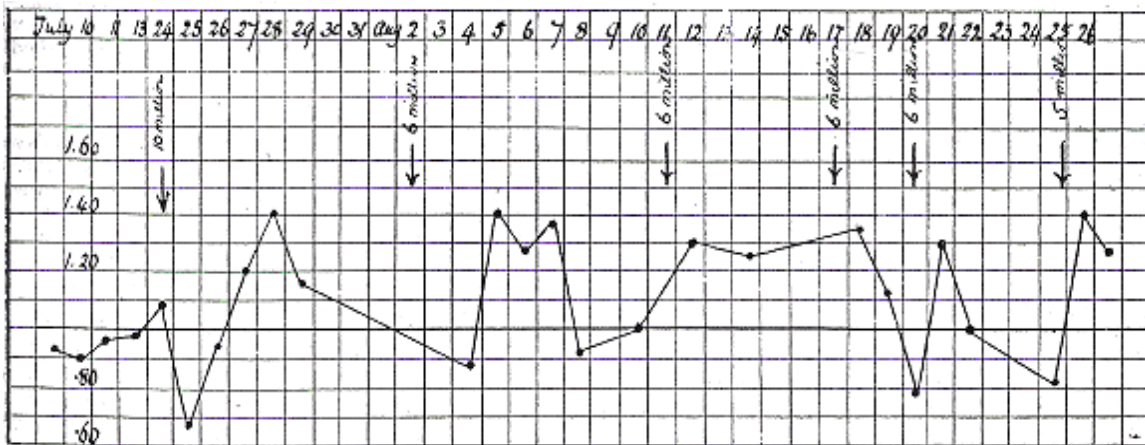


Fig.1.2.1 Tabela de registro do *opsonic index* utilizada por Fleming durante a inoculação da *Acne bacillus* em paciente por ele tratado. "On the etiology of Acne vulgaris and its treatment by vaccines", *The Lancet*, 173(1909): 1037.

Levando em conta suas investigações Fleming, dividiu a acne em três classes seguidas de seu tratamento com vacina terapêutica: A primeira consistia nos casos em que os comedões eram a característica dominante e progrediam tornando-se duros e com estágio postular. Nessa classe o bacilo da acne seria o agente ofensor e o estafilococo, se presente, apresentaria um papel subordinado. Sugeri então um tratamento com uma vacina do bacilo específico. Quando um grande número de comedões tornava-se duro e postular, os estafilococos e o bacilo da acne pareciam ser agentes do processo da inflamação, Fleming sugeriu tratar-se da segunda classe. Nesse caso indicou uma vacina que continha uma mistura de estafilococos e o bacilo da acne. A terceira classe consistia naqueles casos menos comuns em que há uma inflamação mais aguda, tendendo para uma forma quase furuncular. O exame microscópico mostrou que os estafilococos eram o principal ofensor e o tratamento deveria ser dirigido de início ao encontro deste fator⁴³.

1.3 Algumas considerações

Neste capítulo vimos que Fleming iniciou sua carreira no Instituto de Inoculação do hospital *St. Mary* como assistente de Wright. Seu trabalho inicial consistiu em realizar os testes de doenças como acne, furunculose e sicosose.

⁴³ Fleming, "On the etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines", p.1037.

Foram justamente esses testes que o levaram a investigar mais detalhadamente o microrganismo que causava a acne.

Durante esse estágio que durou um ano, ele foi levado a utilizar procedimentos diferentes daqueles adotados por Wright.

Wright defendia a aplicação da vacina terapêutica de estafilococos para acne, sicosose e furunculose. Já Fleming propunha que antes da aplicação da vacina, fossem realizados exames para detectar o tipo de microrganismo que causava a infecção. Propunha para o tratamento, uma vacina com o bacilo específico, ou combinado com estafilococos.

Fleming realizou diversos testes com pacientes que apresentavam infecção na pele. Indicou que a administração com doses apropriada da vacina, derivada do organismo que causava a infecção como a acne, levava a resultados mais favoráveis do que o tratamento que utilizava a vacina de estafilococos⁴⁴.

⁴⁴ Fleming, "On the etiology of acne vulgaris and its treatment by vaccines", p.1037.

CAPÍTULO 2

AS CONTRIBUIÇÕES DE FLEMING PARA O TRATAMENTO DA SÍFILIS

Este capítulo discute as contribuições de Alexander Fleming (1881-1955) no período compreendido entre 1908 a 1911, no sentido de aprimorar as técnicas existentes nos testes para detectar antígenos no sangue de indivíduos sífilíticos.

Além disso, discute a proposta por parte deste cientista, da técnica de administração do SALVARSAN por via intravenosa, para tratamento da sífilis em seres humanos, em substituição ao tratamento com mercúrio.

2.1 Estudos sobre a Sífilis

A primeira grande epidemia de sífilis teria acontecido na Europa, após o retorno de Colombo da América. Ela teria ocorrido inicialmente durante a ocupação de Nápoles por Charles VIII da França, em 1495. Naquele tempo, os médicos pensavam que estavam lidando com uma doença nova e estranha e sentiam-se. No início, estavam completamente impotentes em relação ao tratamento a ser utilizado. Por não saberem qual o tipo de doença com a qual estavam lidando, utilizavam como tratamento, regimes, dietas, sangrias e purgações de forma alternada. Prescreviam substâncias como caldo de carne, ou a carne queimada ou veneno de víboras, mas seus pacientes não apresentavam melhoras nos sintomas.⁴⁵

Contagiosa, a sífilis se espalhou rapidamente. Acreditava-se que a doença era transmitida pelo contato com utensílios, toalhas, etc. ou até mesmo o beijo, e sua origem através do contato sexual não foi inicialmente percebida. Como se manifestava de forma visível na pele e foi tratada inicialmente como escabiose, impetigo e doenças similares⁴⁶.

⁴⁵ J. Johnaton Abraham, "Some account of the history of the treatment of syphilis", *The British Journal Venereal Diseases*, 4(1948):153-160, na p.153.

⁴⁶ *Ibid.*

O tratamento mais utilizado seguia os princípios de Gay de Chauliac (1300-1368) escrito em 1363. Recomendava-se o uso de mercúrio na forma de unguento (mistura à base de vegetais e gordura de porco). As instruções para o tratamento indicavam a necessidade de que a pessoa doente besuntasse o corpo uma vez uma semana com esta preparação. Esse material se utilizado em demasia levava o paciente a apresentar sintomas tais como dores musculares, excesso de saliva e mau cheiro na boca e perda dos dentes. O mercúrio era uma droga perigosa. Por falta de conhecimento nessa nova doença tiveram que usá-lo, e assim procuravam torná-lo menos venenoso. Observou-se, por exemplo, que se o mercúrio fosse misturado com saliva e uma fina emulsão fosse produzida, poderia torná-lo menos perigoso⁴⁷.

O mercúrio foi ministrado então em três maneiras:

- (1) pela unção de um medicamento a base de mercúrio em diferentes partes do corpo diariamente, por um período de quinze a trinta dias;
- (2) por emplastos mercuriais aplicados a cada dois ou três dias. O favorito era o emplastro com saliva;
- (3) por fumigações (exposição aos vapores) em um armário quente com cenóbio (sulfeto de mercúrio), olíbano (incenso extraído de plantas da família das Burseráceas, *Boswellia carteri*) e resina do junípero (*Juniperos commuinis*).

A utilização desse método apresentava um problema em relação às doses aplicadas, pois a quantidade indicada para a cura aproximava-se daquela que o doente poderia suportar.

Contudo apesar de todos esses incômodos o mercúrio continuou a ser utilizado até o início do século XX. Em 1910 o mercúrio era utilizado sob a forma de pílulas, portanto, administrado oralmente. Quando foi banido e substituído por outro tratamento: o arsênico, de que trataremos adiante⁴⁸.

2.2 Testes de Wassermann

Diferentes métodos foram desenvolvidos para detectar anticorpos no sangue durante as infecções. Um deles consistia na fixação de complemento,

⁴⁷ Abraham, "Some account of the history of the treatment of syphilis", p.154.

⁴⁸ *Ibid.*, p.155.

empregada por August P. Von Wassermann (1866-1925) e seus colaboradores em 1905-1906, para o diagnóstico da sífilis⁴⁹.

Os primeiros antígenos⁵⁰ utilizados por Wassermann eram provenientes do fígado de um feto da paciente que havia desenvolvido sífilis e abortado. Este material era rico em *Treponema pallidum* na forma de extrato aquoso. Porém, percebeu-se que um extrato alcoólico do tecido seria mais adequado. Passou-se então a utilizar outros materiais, tais como: coração humano, coração de boi e de cobaias após, a remoção de gorduras⁵¹.

Tais extratos foram empregados por muitos anos, mas as diferenças nas técnicas no que se refere ao modo de preparar de preparar o antígeno tornaram o teste mais complexo e difícil de estabilizar⁵².

Em 1909, Fleming foi encorajado por Wright a estudar o método de Wassermann. Porém, suas investigações o levaram a adotar um novo procedimento que apresentava vantagens em relação ao anterior⁵³.

Este método diferia do método original de Wassermann nos seguintes aspectos, conforme descreveu Fleming:

- (1) em vez de utilizar o extrato salino do fígado sífilítico, um extrato alcoólico do músculo do coração.
- (2) o poder hemolítico natural do soro humano com glóbulos de carneiro foram empregados, assim eliminando a necessidade de soro hemolítico de um coelho imunizado ou o soro de uma cobaia.
- (3) a quantidade de sangue que pode ser coletada é menor e as seringas de sangue forneciam uma ampla fonte de soro para o teste⁵⁴.

⁴⁹ Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than discovery of Penicillin", p. 349.

⁵⁰ Substâncias que provocam a formação de anticorpos pelo corpo como resposta imunitária a introdução de um microrganismo. *MedlinePlus. Medical Encyclopedia dictionary*. Acesso em 16 de outubro de 2008.

⁵¹ Leading Articles, "Wassermann", *The British Medical Journal*, 2(1966):436-437, na p. 436.

⁵² *Ibid.*

⁵³ Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin", p. 349.

⁵⁴ Alexander Fleming, "Demonstration of simple method of serum diagnosis of syphilis by the complement deviation method", *Proceedings of the Royal Society of Medicine*, 2(1909):220-225, na p.220.

Segundo Fleming, essa modificação no teste era idêntica a usada por Hecht em 1742. Nesse caso, o soro a ser testado fornecia o complemento e os anticorpos que destruíam os antígenos (como as bactérias) em combinação com outro complemento. Entretanto, Fleming diferia de Hecht em detalhes técnicos, principalmente quanto à utilização de doses menores de soro na preparação do antígeno⁵⁵.

De acordo com Fleming as substâncias utilizadas para o teste foram:

- (a) Extrato alcoólico do músculo de coração moído na proporção de uma parte de coração para cinco porções de álcool e da extração após uma hora a 60°C. Mantido em estoque e diluído a 10 por cento em solução salina.
- (b) Glóbulos de carneiro lavados e mantidos a 10 por cento em suspensão salina normal.
- (c) Soro retirado de uma seringa de sangue ⁵⁶.

Neste artigo, Fleming, indicava que seus estudos poderiam ser utilizados no controle e administração do mercúrio no tratamento da sífilis e argumentava que seriam possível, por intermédio desses testes, realizados durante o tratamento, diminuir sua duração em alguns casos, enquanto em outros poderia ser necessário seu prolongamento além dos limites normais, evitando os incômodos de um agravo da doença⁵⁷.

Esse foi um estudo bastante importante, pois esclareceu aspectos em relação ao tratamento da sífilis através do mercúrio, diminuindo seus efeitos colaterais.

⁵⁵ Fleming, "Demonstration of simple method of serum diagnosis of syphilis by the Complement deviation method", p.220.

⁵⁶ *Ibid.*,p. 223.

⁵⁷ *Ibid.*,p. 224.

2.3 O Tratamento da sífilis

Em abril 1910, o bioquímico Paul Ehrlich (1854-1915) anunciou no Congresso de Wiesbaden (Alemanha) sua pesquisa para o tratamento da sífilis⁵⁸.

Ehrlich encontrou evidências de que o arsênico possuía uma ação específica muito forte sobre o agente patogênico da sífilis. Entretanto, seu uso não era seguro, devido à sua extrema toxicidade. Após muitas experiências com pacientes, das quais 605 preparações diferentes foram utilizadas, e obteve-se a composição química final de um benzol do dioxy-diarmido-arseno. Esta composição recebeu o nome de Salvarsan (salvo pelo arsênico) 606. O dicloreto da substância era estável, mas o sal do sódio usado para a injeção era difícil de ser administrado⁵⁹.

Ehrlich era um admirador de Wright, principalmente pelo seu trabalho no tratamento da febre tifóide e pesquisas sobre substâncias que auxiliam as células de defesa na fagocitose. Indo a Londres para proferir palestras de quimioterapia, enviou para o laboratório de Wright em agosto de 1910 amostras do Salvarsan 606. Seu objetivo era que fosse estudada uma maneira de administrá-lo por via intravenosa em seres humanos, uma vez que a substância oxidava rapidamente quando em contato com o ar e por meio intramuscular era inviável, pois a injeção era extremamente dolorosa⁶⁰.

Com o auxílio de Leonard Colebrook (1883-1967), também assistente de Wright, Fleming desenvolveu um método para a administração do Salvarsan 606 via intravenosa e controlava os resultados com testes de Wassermann⁶¹.

No artigo em que escreveu sobre o assunto, Fleming referia-se ao Salvarsan como uma pesquisa muito discutida no período e que sua constituição química já havia sido descrita várias vezes, e o propósito de suas pesquisas era investigar o mecanismo da administração. Como já foi dito, o

⁵⁸ Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin", p.356.

⁵⁹ Literay Notes "Ehrlich's antisyphilitic remedy", *The British Medical Journal*, 1(1910):793-794, na p.793.

⁶⁰ Andre Marois, "The Life of Sir Alexander Fleming" (New York: E. P. Dutton & Co, 1959), <http://archive.org>,(acesso em 03 de março de 2008):66-68.

⁶¹ Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin", p.356.

| Summary of Cases Treated. | | | | | Summary of Cases Treated—(continued). | | | | | | |
|---------------------------|--|-----------------|-------------------|---|---|-----|---|-----------------|-------------------|---|---|
| No. | Nature of lesion. | Intra-venously. | Intra-muscularly. | Result. | Wassermann reaction. | No. | Nature of lesion. | Intra-venously. | Intra-muscularly. | Result. | Wassermann reaction. |
| 1 | Tertiary ulceration of nose, progressing under very energetic mercurial treatment. | 0.4 | 0.5 | Practically nil. | + 2 months after. | 26 | Chancere 9 months ago. Now no lesion but Wassermann positive. | 0.5 | — | — | - 6 weeks after. |
| 2 | Secondary ulceration of throat. | — | 0.5 | Complete healing. | + 5 " " | 27 | Syphilis 5 years ago. No lesion, but Wassermann positive. | 0.4 | — | — | - 5 " " |
| 3 | Ditto. | 0.4 | — | " | - 1 month | 28 | Secondary rash and throat. | 0.4 | — | Cleared up in 4 days. | - 2 months after. |
| 4 | Latesecondary ulceration of throat. | 0.4 | — | " | - 2 weeks | 29 | Ulcer on leg, tertiary. | 0.5 | — | Healed in 11 weeks. | - in 1 month. |
| 5 | Syphilis 10 years ago. Subcutaneous nodules on arm. | 0.4 | — | " | - 4 months | 30 | Tabes. Argyll Robertson pupil. Romberg's sign, pains. | 0.4 | — | Pains less since 2 days after; able to work 2 hours a day longer than before. | + 3 weeks after. |
| 6 | Syphilis 8 years ago. Eczema, ? syphilitic in origin. | 0.5 | — | Eczema much improved. | + 4 months | 31 | Tertiary ulcer on neck following operation for glands. | 0.4 | — | Definite but not rapid improvement. | + 3 " " |
| 7 | Secondary rash and throat. Joint pains. | — | 0.4 | Complete recovery. (High fever for 10 days.) | - 4 weeks | 32 | Tertiary ulcer on palate. | 0.4 | — | Quickly healed. | + 3 " " |
| 8 | Tertiary ulceration of scalp. Resisted mercurial treatment. (Injections of calomel.) | — | 0.7 | Partial healing of scalp. Node appeared on forehead and another on tibia. | - 6 weeks after first injection. | 33 | Double interstitial keratitis. | 0.2 | — | Eyes much worse after. | Remains positive. |
| 9 | Aged 14. Congenital gumma in sternomastoid, ulcer on neck. | — | 0.5 | Nil. Complete recovery. | + 10 weeks after. | 34 | Iritis and granulomatous patch on skin said to be syphilitic. Wassermann reaction negative. | 0.4 | — | Eyes rather worse. Skin remains same. | Wassermann remains — |
| 10 | Late secondary rash and ulceration of legs. Laryngitis. | — | 0.1 | Gumma broke down. Complete healing. | - 10 weeks after third injection. | 35 | Tertiary syphilitic nose and cheeks. | 0.5 | — | Rapid healing. | + 2 weeks after. |
| 11 | Congenital, aged 18, sinuses connected with knee-joint (?) Deaf. | — | 0.26 | Complete healing. | Remained + 12 weeks after last injection. | 36 | Recurrent conjunctivitis. | 0.4 | 0.6* | No relapse of eye condition in 3 months. | + 3 months after. |
| 12 | Tertiary ulceration of neck. (Resisted mercury.) | — | 0.5 | Rash and ulceration cleared up. | Not seen since 14 days after when +. | 37 | Chancere, rash. Throat. | 0.5 | — | Cleared up completely in 5 days. | + 2 " " second dose. |
| 13 | Tertiary ulceration of foot. | — | 0.4 | Nil. Some improvement in hearing. | + 6 weeks after second injection. | 38 | Primary chancere. | 0.5 | — | Cleared up in 1 week. | - 6 weeks after. |
| 14 | Tertiary ulceration of knee. Gumma shoulder. | — | 0.45 | Healed in 10 days. | + 6 weeks after second injection. | 39 | Ulcer knee. Syphilis 6 years ago. | 0.5 | — | Cleared up in 9 days. | + 6 " " |
| 15 | Tertiary ulceration over deltoid. | — | 0.4 | Healed in 20 days. | - 2 months after | 40 | Tabes. | 0.4 | — | No change in 1 month. | Not seen since 14 days after. |
| 16 | General paralysis of the insane. | — | 0.4 | Not healed in 2 months. | - 4 months after. | 41 | Secondary rash. | 0.5 | — | Disappeared in 3 days. | + 1 month after. |
| 17 | Tertiary. Periostitis humerus, 2 years. Pain in knee with erosion of bone. | — | 0.3 | Still | - 1 " " | 42 | Secondary rash and throat. | 0.5 | — | Cleared up in 5 days. | - 6 weeks after. |
| 18 | Congenital. Old interstitial keratitis and ulceration of thigh. No active lesions. | — | 0.4 | Healed in 7 days. | Still + 2 months after. | 43 | Syphilis 6 years before, superficial glossitis. | 0.5 | — | Cleared up with in 1 week. | - 6 weeks after. |
| 19 | Interstitial keratitis both eyes. | — | 0.4 | Not seen since 2 weeks after. Then positive. | + 2 months after. | 44 | Tertiary ulceration palate. (Resisted mercury.) | 0.5 | — | Ulceration stopped and healing in 17 days. Perforation remains. | + 4 " " |
| 20 | Interstitial keratitis. | — | 0.2 | Nil. | + 3 months after. | 45 | Chancere. Secondary rash. | 0.4 | — | Cleared up in 1 week. | - 3 months after. |
| 21 | Ulceration of palate, pharynx, and larynx (congenital). | — | 0.2 | Pain rapidly disappeared from knee and arm. | + 4 " " | 46 | Chancere 2 years before. Gummata on scalp. Later developed hæmoptysis and gummata on face. | 0.4 | 0.6 | Nil. Everything cleared up rapidly. | + 3 " " |
| 22 | Secondary rash and throat. | — | 0.2 | Nil. | + 5 " " | | | | | | Remains + 7 months after first injection and 4 months after second injection. |
| 23 | Ulceration of throat 13 months after infection. | — | 0.25 | Eyes worse for 2 weeks, and not well 2 months after. | + 2 " " | | | | | | |
| 24 | Primary chancere. | — | 0.2 | Eyes much improved in 1 week. | Not seen since 1 week after. | | | | | | |
| 25 | Ditto. | — | 0.2 | Complete healing. | + 2 months after. | | | | | | |
| | | — | 0.4 | Cleared up in 1 week. | - 6 weeks " | | | | | | |
| | | — | 0.5 | Improvement only slight. | - " " | | | | | | |
| | | — | 0.5 | Cleared up in 4 days. | - 6 " " | | | | | | |
| | | — | 0.5 | Cleared up in 5 days. | Not seen since. | | | | | | |

Fig. 2.3.1 Alexander Fleming, "On the use of Salvarsan in the treatment of Syphilis", *The Lancet*, 177(1911):1633.

método intramuscular era muito doloroso e a administração via oral do medicamento se tornava falha em função da oxidação que sofria em contato com o ar. Fleming apresentou, nesse artigo, uma tabela com os resultados da

administração do Salvarsan via intramuscular e intravenosa em pacientes por ele tratados (ver fig. 2.3.1) ⁶².

O cientista escocês descreveu que o método intravenoso apresentaria muitas vantagens, tais como: primeiro, ser menos doloroso e segundo, permitia ao paciente uma melhora rápida e monos recorrências menos comuns.

Os primeiros métodos para a administração do Salvarsan intravenoso foram assim descritos por Fleming:

Desde que iniciamos o método intravenoso usamos diversas formas de instrumentos para a administração da droga. No início nós usamos o que nos pareceram instrumentos muito simples, um funil graduado conectado com uma agulha, que fosse introduzida em uma veia, a taxa de fluxo que é simples graduado pela altura do funil. A vantagem do instrumento é sua simplicidade. A desvantagem é o tamanho da agulha, se for pequena a taxa de fluxo é lenta, e a operação toma muito tempo, quando a o uso de uma agulha muito grande é desagradável ao paciente⁶³.

Os primeiros instrumentos que Fleming utilizou para a administração do Salvarsan apresentavam problemas como: dificuldade em manusear as duas seringas, uma com o arsênico e a outra com a solução salina quando agulha já se encontrava na veia do paciente, o risco de contaminação por outros organismos era muito grande, pois, utilizavam-se mais de uma pessoa durante o processo e a quebra do material utilizado constituído por vidro⁶⁴.

O diagrama ilustrado por Fleming (ver fig. 2.2.2) descrito neste artigo nos dá uma idéia do aparelho por ele utilizado: Uma seringa graduada de 20 cc (F) conectada a uma torneira tripla (B). Um tubo de borracha com oito centímetros

⁶² Alexander Fleming, "On the use of Salvarsan in the treatment of syphilis", *The Lancet*, 177(1911):1631.

⁶³ Fleming & Colebrook, "On the use of Salvarsan in the treatment of syphilis", 1631-1634, na p. p.1631.

⁶⁴ *Ibid.*, p.1632.

de comprimento, uma ampola de vidro para apanhar as bolhas(C), em seguida, cerca de trinta e oito centímetros de tubo de borracha ligado na sua parte extrema inferior um metal apropriado para uma agulha.

Próximo a agulha neste tubo de borracha longo havia um pequeno pedaço de tubo de vidro que funcionava como uma janela(d). O outro lado da torneira estava conectado por um pedaço de tubo de borracha com cerca de oito centímetros com o filtro de lã de vidro (E) que estava associado por um pedaço de tubo com 15 centímetros a outra torneira tripla(F), as outras saídas, por vez, ligados por tubos de cerca de quinze centímetros de comprimento em tubos de vidro de cinco milímetros. , em um frasco era armazenado o Salvarsan e no outro a solução salina⁶⁵.

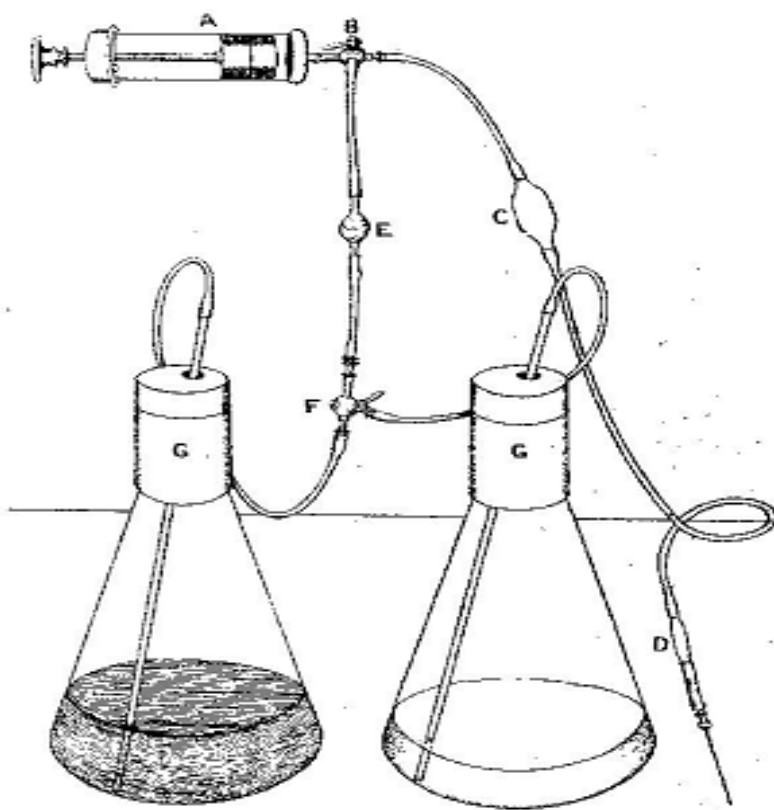


Fig. 2.2.2 Aparelho para administração do Salvarsan intravenoso.
Alexander Fleming, "On the use of Salvarsan in the treatment of syphilis", *The Lancet*, 177(1911):1632.

⁶⁵ Fleming, "On the use of Salvarsan in the treatment of syphilis", 1631-1634, na p.:1632.

A partir das observações e testes de Wassermann que havia realizado, Fleming percebeu que uma dose de Salvarsan já era suficiente para o tratamento dos pacientes com sífilis.

Nesse artigo Fleming, não expressou qualquer opinião sobre o tratamento da sífilis com mercúrio. No entanto, afirmou que o Salvarsan ao ser administrado não oferecia perigos e que as condições clínicas dos pacientes apresentavam visíveis melhoras, diferente do que acontecia através do tratamento com mercúrio⁶⁶.

2.3 Algumas considerações

Neste capítulo vimos que Fleming desenvolveu novas técnicas que permitiram o aperfeiçoamento do teste de Wassermann e desenvolveu um aparato para a aplicação do SALVARSAN.

O material anteriormente utilizado para o teste de Wassermann era de difícil obtenção (fígado de feto abortado), enquanto que na proposta de Fleming o extrato era obtido a partir do coração de boi, carneiro ou cobaias, portanto, mais facilmente de ser encontrado.

O aparato desenvolvido por Fleming para a administração do SALVARSAN em sífilíticos possibilitou um tratamento mais rápido e menos doloroso do que o mercúrio, que era utilizado na época.

⁶⁶ Fleming, "On the use of Salvarsan in the treatment of syphilis", p.1633.

CAPÍTULO 3

ESTUDOS SOBRE AS INFECÇÕES EM FERIMENTOS

Este capítulo apresentará as pesquisas de Almroth Wright (1861-1947) e Alexander Fleming (1881-1955) desenvolvidas no período que corresponde à Primeira Guerra Mundial. Essas pesquisas se referem à utilização de soluções hipertônicas salinas para o aumento da fagocitose, para o tratamento das feridas infeccionadas, agravadas nas trincheiras.

Além disso, discute os efeitos de alguns anti-sépticos químicos no tecido humano, que eram utilizados após o ferimento ter sido infectado.

3.1 O tratamento de feridas

O tratamento de feridas é um problema muito antigo. A humanidade sempre foi propensa a cortes e equimoses⁶⁷ acidentais, e apesar das causas do ferimento serem geralmente óbvias e observadas facilmente, somente a partir do século XX os processos de sua infecção foram compreendidos⁶⁸.

O objetivo do tratamento da ferida sempre foi reduzir os riscos e minimizar as complicações, no entanto, os métodos variaram de tempos em tempos e sempre houve conflitos vigorosos de opiniões a respeito do melhor procedimento a ser adotado⁶⁹.

Em alguns tratados do *Corpus Hipocraticum*, datados do século IV a.C já apareciam recomendações sobre o tratamento das feridas com ligeiras variações. Recomendava-se um tratamento de repouso para o paciente e a imobilização do membro afetado, e aplicações de vinho ou vinagre com um pano de linho limpo. Nesse caso, se fazia restrição às sangrias. Não se tem muitos detalhes de como os cortes maiores eram suturados. Provavelmente,

⁶⁷ Mancha na pele resultante de hemorragia. *MedlinePlus. Medical Encyclopedia dictionary*. Acesso em 16 de outubro de 2008.

⁶⁸ Zachary Cope, "The treatment of wounds through the ages", *The Medical History*, 3(1958):163-174, na p.163.

⁶⁹ *Ibid.*

era feito seu envolvimento com faixas⁷⁰. A sugestão que aparecia nesse tratado era de que as feridas fossem tratadas com unguentos, a fim de promover a saída do pus, remover o material necrosado e reduzir a inflamação. Não havia indicações de que a produção de pus fosse vista como etapa necessária no caminho da cura, como seria sugerido mais tarde. Nesses tratados havia a recomendação da utilização da água do mar para a limpeza das feridas, pois diminua o inchaço e auxiliava na cura⁷¹.

A partir do século XIV as armas de fogo passaram a ser utilizadas na Europa, e um tratamento comum não foi suficiente para tratar as feridas por elas produzidas. A prática árabe utilizava nesse processo cauterizar ou esquentar com óleo tais feridas e esses procedimentos tornaram-se habituais, até o século XVI⁷².

Em 1867, o médico inglês Joseph Lister (1827-1912), publicou uma série de artigos nas revistas *The Lancet* e *The British Medical Journal*, nos quais anunciava uma nova técnica para o tratamento de feridas com ácido carbólico, por ele denominado anti-sepsia⁷³. Lister assim se expressou:

No curso de uma investigação prolongada na natureza da inflamação e das condições saudáveis e mórbidas do sangue, cheguei há anos à conclusão de que a causa essencial da supuração das feridas é a sua decomposição, causada pela influência da atmosfera sobre o sangue ou do soro retido dentro delas, no caso das feridas contundidas e sobre as partes de tecido destruídas pela violência do ferimento.

O material empregado foi o ácido carbólico ou fênico, um composto orgânico volátil, que parece exercer uma influência peculiar destrutiva em várias formas de vida, e daqui é o anti-séptico mais poderoso de que temos conhecimento.⁷⁴

⁷⁰ Cope, "The treatment of wounds through the ages", p. 163.

⁷¹ Richard D. Forrest, "Early history of wound treatment", *Journal of the Royal Society of Medicine*, 75(1982):198-205, na p.198.

⁷² *Ibid.*, p. 201.

⁷³ *Ibid.*

⁷⁴ Joseph Lister, "Antiseptic principle in the practice of surgery". *The British Medical Journal*, 2(1867):246-248, na p.246

O ácido carbólico foi usado primeiramente na ferida. Em seguida, Lister a cobria com um pedaço de linho branco também embebido na substância e prendia com uma atadura. Por fim, protegia o curativo com uma folha metálica para evitar a evaporação do anti-séptico⁷⁵.

Apesar de ser extremamente simples, o sistema de assepsia de Lister foi adotado por profissionais de todo o mundo. Entretanto alguns questionavam o uso do anti-séptico, pois protegia o paciente, mas muitas vezes danificavam o tecido humano⁷⁶.

A descoberta do papel dos microrganismos que causavam a supuração permitiu aos médicos do período limpar e suturar feridas com certo êxito. Muitos concebiam a idéia de que os anti-sépticos poderiam purificar e esterilizar as feridas na qual já se estabelecera uma infecção⁷⁷.

Durante a Primeira Guerra Mundial, foram empregados outros tratamentos para os ferimentos infeccionados, que veremos nesse capítulo.

3.2 O período de Guerra

Durante a 1ª Guerra Mundial (1914-1918), Fleming serviu no Corpo Médico das Forças Armadas da Inglaterra como capitão, junto com o coronel Wright.. Trabalhavam no laboratório de pesquisas sobre ferimentos de guerra, na cidade de Bolougne na França⁷⁸.

Em agosto de 1914, vacinas desenvolvidas a partir dos microrganismos atenuados contra a febre tifóide e o cólera foram solicitadas a Wrigth pelos governos da Inglaterra, França, Bélgica e Rússia. Essas vacinas foram administradas em aproximadamente 120 mil soldados, evitando uma epidemia⁷⁹.

A primeira guerra mundial trouxe problemas nunca enfrentados antes pela medicina. O elevado uso de explosivos, armas de fogo e o estabelecimento das trincheiras (ver fig. 3.2.1 e 3.2.2) provocaram nos

⁷⁵ Lister "Antiseptic principle in the practice of surgery", p. 246

⁷⁶ Forrest, "Early history of wound treatment", p.202.

⁷⁷ *Ibid*,

⁷⁸ Birch, *Alexander Fleming*, p. 27.

⁷⁹ Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin", p.350.

soldados infecções que levavam a morte ou amputação do membro atingido. O controle das infecções causou uma grande surpresa para os médicos, que tinham pensado erroneamente que o tratamento com anti-séptico local impediria, ou modificaria o desenvolvimento das feridas contaminadas⁸⁰.



Fig. 3.2.1 Soldados em trincheiras durante a 1ª guerra mundial. Disponível em www.google.com.br/imagem/trincheira. (Acesso em 15 de junho de 2009.)

⁸⁰ Forrest, "Early history of wound treatment", p. 202.



Fig. 3.2.2 Soldados em trincheiras durante a 1ª guerra mundial. Disponível em www.google.com.br/imagem/trincheira. (Acesso em 15 de junho de 2009.)

Foi montado um hospital que funcionava como laboratório de pesquisas em outubro de 1914 na cidade de Boulogne, para que Wright, Fleming e outros bacteriologistas realizassem as pesquisas sobre as infecções em ferimentos causados por armas de fogo, gás gangrena⁸¹ e o tétano.

O problema ultrapassou as dificuldades, em relação a tudo aquilo que se havia experimentado anteriormente, com respeito à frequência e malignidade das infecções em feridas causadas pela guerra. Nesse período inicial das pesquisas o problema foi atacado por duas maneiras.

Uma delas foi através da solução hipertônica salina, método defendido por Wright. Esse método exigia o emprego de soluções de sal em concentrações variadas, mas de pouca ação germicida. E a outra, a utilização

⁸¹ Quando a gangrena já instalada progredia, exalava do local da infecção um gás produzido pela fermentação do bacilo *Clostridium*. A doença nesse estágio era chamada de gás gangrena. *MedlinePlus. Medical Encyclopedia dictionary*. Acesso em 16 de outubro de 2008.

de anti-sépticos químicos com grande ação germicida, como o ácido carbólico e o hipoclorito de sódio⁸².

No início das pesquisas do material retirado dos soldados doentes, os médicos acreditavam que a infecção era causada por fragmentos de lama, roupas e plantas levados pelo projétil.

Para Fleming, o estudo bacteriológico de feridas determinava o seu tratamento e a sua cura, sendo elas mais leves ou mais graves. Pesquisou a contaminação das feridas de guerra por bactérias, examinando 12 amostras de roupas dos soldados feridos em setembro de 1915, quando chegaram ao hospital de Bolougne onde ele trabalhava. As amostras foram distribuídas dessa forma: 4 amostras apresentavam o bacilo do tétano, 5 amostras continham estreptococos, 2 amostras com estafilococos e uma amostra com propriedades não identificadas, que ele definiu como não patogênico⁸³.

Nessa pesquisa sobre as bactérias que causavam as infecções nos ferimentos de guerra, Fleming pode notar um número muito grande de leucócitos realizando a fagocitose, o que indicava a resistência à infecção. Era incomum ver, no pus, organismos que não tinham sido ingeridos pelos leucócitos, neste caso em feridas abertas. O número de fagócitos era muito elevado nessas feridas, diferente do número encontrado na prática civil. A explicação dada por ele foi que essas feridas infeccionavam subitamente em um indivíduo saudável, diferente das outras, onde a infecção se instalava lentamente⁸⁴.

Para as feridas de guerra infectadas por bactérias, os médicos utilizavam anti-sépticos químicos, mas os resultados não eram satisfatórios. Fleming e Wright iniciaram um estudo sobre a ação dos anti-sépticos químicos no tecido humano. Utilizaram para isso tubos de ensaio com culturas das bactérias, e perceberam que os anti-sépticos em alta concentração possuíam propriedades que as destruíam, mas quando aplicados em tecido vivo impediam a formação dos fagócitos e danificavam o tecido severamente⁸⁵.

⁸² Henry Drysdale Dakin, "Biochemistry and war problems", *The British Medical Journal*, 1(1915):833-837, na p.833.

⁸³ Alexander Fleming, "On the bacteriology of septic wounds". *The Lancet*, 186(1915):638-648, na p.638.

⁸⁴ *Ibid.*, p. 642.

⁸⁵ Colebrook, "Almroth Wright - Pioneer in immunology", p. 638.

Fleming realizou um experimento que mostrou como os anti-sépticos não conseguiam alcançar os microrganismos em regiões mais profundas como ossos e fibras musculares. Com um tubo de ensaio remodelado em sua parte inferior, simulou uma ferida e sulcos do tecido muscular (ver fig.3.2.2). Colocou até sua metade caldo de carne e uma variedade de micróbios de uma ferida infectada. Em seguida o tubo foi preenchido com anti-sépticos em grande concentração, permanecendo por algumas horas, foi esvaziado e preenchido com caldo de carne estéril. O procedimento foi realizado várias vezes e o resultado sempre o mesmo: os micróbios permaneciam no caldo de carne⁸⁶.

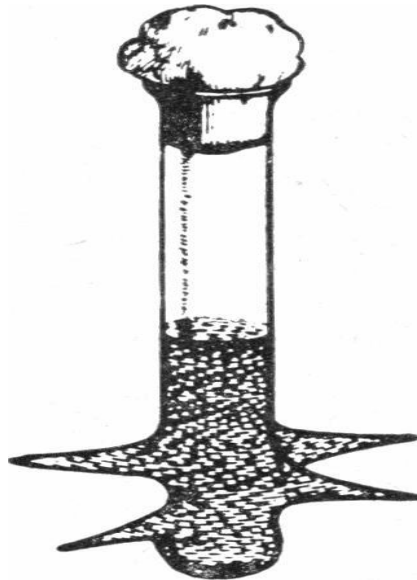


Fig. 3.2.2. Experimento de Fleming sobre a ação dos anti-sépticos em locais mais profundos de uma ferida. Leonard Colebrook, "Almroth Wright – Pioneer in immunology", *British Medical Journal*; 2(1953):638.

Diante dessas evidências Wright, indicou como tratamento de feridas infectadas a lavagem com soluções hipertônicas salinas e depois a proteção com curativos limpos.

Soluções hipertônicas salinas foram usadas por Wright para provocar um aumento de fluxo na linfa da superfície da ferida com o objetivo de facilitar e acelerar os processos naturais de regeneração. Análises laboratoriais feitas por

⁸⁶ Colebrook, "Almroth Wright - Pioneer in immunology", p.638.

ele e por Fleming mostraram, que o ácido carbólico e os outros anti-sépticos de uso geral, mais provavelmente prejudicavam do que auxiliavam quando aplicados às feridas em que a infecção já estivesse estabelecida. Igualmente mostraram que a maioria dos anti-sépticos perdia seu efeito na presença de sangue ou de soro, e que os anti-sépticos eram incapazes de penetrar em locais profundos das feridas causadas por tiro ou lesões mais complicadas. Wright e seus colaboradores aplicaram uma solução fisiológica hipertônica de sal à ferida. Por este meio, o fluxo livre do soro foi induzido e este soro fresco exerceu uma ação antibacteriana mais forte. Esse método foi bastante empregado na época e produziu bons resultados⁸⁷.

3.3 Anti-sépticos utilizados durante a guerra.

Em agosto de 1915, o médico Henry Drysdale Dakin (1880-1951) escreveu um artigo no qual comparou a ação dos diversos anti-sépticos, após estudos, utilizados no período de guerra para tratamento de feridas infectadas.⁸⁸

Dakin, assim se expressou:

A fim de fazer uma escolha justa do anti-séptico que, provavelmente, terá resultados mais úteis no tratamento de feridas infectadas, diferentes fatores foram considerados: a atividade germicida incluindo a irritação das substâncias, sua toxicidade, solubilidade, habilidade de penetrar nos tecidos e de ser absorvida, e suas reações químicas com proteínas de outro tecido⁸⁹.

⁸⁷ Almroth E. Wright, "Wound infections; some new methods for study the various factors which come into consideration in their treatment", *The British Medical Journal*, 1(1915):762-764, na p.762.

⁸⁸ Henry Drysdale Dakin, "On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds", *The British Medical Journal*, 1(1917):318-320, na p.318.

⁸⁹ *Ibid.*

Dakin iniciou pelo Fenol, que caracterizou como tendo a ação germicida muito baixa, especialmente ao atuar na presença do soro humano. Quando usado em concentração suficientemente elevada para ação germicida eficiente, causava a destruição do tecido saudável.

Em seguida, o bioquímico citou o Peróxido de Hidrogênio substância que possuía resultados encorajadores quando testado de encontro às bactérias no tubo de teste, mas quando usado sobre o ferimento a substância tinha pouca ação germicida. Sua ação poderia se restringir a um curto intervalo de tempo. A ação mecânica detergente ligada à liberação rápida do gás oxigênio sobre as superfícies contaminadas era provavelmente, era melhor do que algumas ações anti-sépticas exercidas por ela. A água oxigenada, com respeito a sua ação anti-séptica, deveria ser considerada até a data de pouco valor, mesmo de encontro a um microrganismo anaeróbico⁹⁰.

Para Dakin, o Cloreto de Mercúrio perdia prontamente a maioria de sua ação anti-séptica na presença de muitos componentes do tecido, e, como já se sabia, irritava mesmo em solução diluída. Era inútil para a esterilização do pus quando empregado em concentração razoável. Nos tubos de testes apresentava ação germicida mais elevada, porém para o tratamento de feridas contaminadas era ineficaz.

O Nitrato de prata, segundo Dakin era melhor que o cloreto de mercúrio, mas quando usado em altas concentrações produzia irritação. Muitos componentes do tecido inibiam sua ação. A sensibilidade aos compostos da prata se manifestava de forma desagradável⁹¹.

Prosseguindo seus estudos sobre os anti-sépticos químicos, Dakin mencionou o Iodo, que tinha um grande valor para a desinfecção da pele, mas ineficaz quando usado em feridas profundas, devido à coagulação e à irritação das proteínas dos tecidos. O poder penetrante do iodo era insignificante, e as feridas que foram tratadas com ele tinham cicatrização mais lenta do que sob a ação de outro anti-séptico.

A última substância estudada por Dakin foi o Hipoclorito de sódio, que possuía ação germicida elevada e muitas outras propriedades desejáveis, mas

⁹⁰ Dakin, "On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds", p.318.

⁹¹ *Ibid.*

como era preparada de diversos modos, continha alcalóides livres, e era irritante quando aplicado às feridas⁹².

Encontrar um anti-séptico que não danificasse os tecidos, e atuasse como um antibacteriano mesmo na presença de sangue e do soro era de vital importância para os cirurgiões da época.

A utilização de soluções com Hipocloritos era defendida por muitos cirurgiões, pois possuía ação germicida elevada, apesar dos problemas que causava⁹³.

Uma solução utilizada no período para o tratamento de feridas infectadas durante a guerra era o “Eusol”, método desenvolvido pelo Dr. James Lorrain Smith (1862-1931) e colaboradores. Seus compostos básicos eram o ácido hipocloro, borato de cálcio e cloreto de cálcio. Smith assim justifica o seu uso:

O objetivo preliminar da investigação foi encontrar um anti-séptico que poderia ser aplicado para uma primeira limpeza no ferimento para impedir a sepsis⁹⁴. O anti-séptico ideal para o tipo de infecção que ocorre nas feridas produzidas no campo de batalha deve possuir ação rápida na destruição de esporos assim como ser comum e barato⁹⁵.

Outro método foi desenvolvido por Dakin, seguindo a idéia do Dr. Lorrain Smith, utilizava no seu preparo hipoclorito de sódio e ácido bórico, como ele descreveu:

O princípio de preparo da solução é a seguinte: O cloreto de cálcio é para decompor uma solução de carbonato de sódio.

⁹² Dakin, “On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds”, p.319.

⁹³ Forrest, “Early history of wound treatment”, p. 202.

⁹⁴ Presença de microrganismos patogênicos ou suas toxinas no sangue ou nos tecidos. <http://MedlinePlus.Medical Encyclopedia dictionary>. Acesso em 16 de outubro de 2008.

⁹⁵ J. Lorrain Smith, “Antiseptic action of Hypochlorous acid and its application to wound treatment”. *The British Medical Journal*, 2(1915):129-133, na p.133.

Depois de filtrada a solução, é adicionada hipoclorito de sódio. Como se torna uma solução ligeiramente alcalina é adicionado ácido bórico em tal quantidade que a solução é ácida em fenolftaleína suspensa em água, mas ainda alcalina ao tornassol. A solução resultante contém uma mistura equilibrada de hipoclorito e poliboratos de sódio com pequenas quantidades de ácido hipoclorito e bórico livres. Assim a ação cáustica irritante do alcalóide livre é evitada, mesmo que seja de forma rápida⁹⁶.

Um grande número de cirurgiões do período utilizava como prática a retirada superficial dos tecidos danificados. Isso reduziu de forma significativa a infecção. O espaço livre era uma maneira mais eficaz de aplicar os anti-sépticos químicos. Essa técnica, desenvolvida durante a primeira guerra na França foi utilizada por muitos médicos, e nesse período evitou milhares de mortes⁹⁷.

Apesar da maioria dos médicos utilizarem os anti-sépticos químicos como tratamento, em feridas infectadas, e esse procedimento, ter muitas vantagens, Wright era contra a sua aplicação, pois impedia o trabalho dos fagócitos.

Dakin em 1917 escreveu um artigo contrário às idéias de Wright sobre a aplicação de soluções hipertônicas salinas. Ele se posicionou de forma favorável aos anti-sépticos químicos dessa forma:

O motivo de minha pesquisa em anti-sépticos foi unir uma busca para o mais ativo germicida e sua ação nos microrganismos em várias partes do corpo. Com a entrada dessas substâncias, esperava-se uma maneira de esterilização rápida da ferida, mas os resultados eram na maior parte decepcionantes. O problema era evidente e a idéia de que as feridas laceradas e

⁹⁶ Dakin, "On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds", p.320.

⁹⁷ Forrest, "Early history of wound treatment", p.205.

suas poderiam ser esterilizadas com a aplicação isoladas de anti-sépticos mais potentes, teve que ser abandonada. Os métodos fisiológicos indicaram o perigo e a futilidade de tal procedimento, e a partir dele o papel de que a esterilização não tinha efeito, e a destruição do tecido vivo pela aplicação desses anti-sépticos não compensava a vantagem já adquirida. Indicava que apesar das experiências realizadas o método fisiológico não poderia refutar o valor de cada anti-séptico no tratamento de feridas⁹⁸.

Dakin realizou experiências com o propósito de promover a utilização dos anti-sépticos. Ele limpou as feridas com ácido carbólico puro com a intenção de possibilitar a eliminação dos microrganismos. Segundo Dakin, o fato de se encontrar microrganismos nas feridas não indicava que os anti-sépticos fossem ineficazes quando aplicados em condições apropriadas⁹⁹.

Essa discussão foi acompanhada pelo Dr. William Watson Cheyne, presidente da *Royal College of Surgeons of England*, em uma controvérsia. Tendo sido um dos principais assistentes de Lister, Cheyne defendia que se um anti-séptico fosse apropriadamente aplicado em uma ferida contaminada, a infecção seria controlada¹⁰⁰.

Durante o período de guerra, as pesquisas para tratamento das feridas infeccionadas, determinaram uma discussão entre os pesquisadores que defendiam o uso de anti-sépticos químicos e Wright, que defendia o uso de soluções hipertônicas salinas.

Fleming que auxiliava Wright no tratamento de ferimentos com soluções salinas, desenvolveu experimentos, que colocavam em dúvida a eficácia dos anti-sépticos químicos.

⁹⁸ Henry Drysdale Dakin, "Biochemistry and war problems", *The British Medical Journal*, 1(1915):833-837, na p.836.

⁹⁹ Dakin, "Biochemistry and war problems", p.837

¹⁰⁰ Cope, "The treatment of wounds through the ages", p.171.

3.4 Estudos do *Influenzae*

O ano de 1918 teve dois momentos marcantes na Europa. Um deles foi a epidemia causada pela infecção do *Bacillus influenzae*¹⁰¹ que levou a morte aproximadamente 20.000.000 de pessoas entre soldados e civis. O segundo foi o fim da 1ª Guerra Mundial em novembro¹⁰².

A epidemia do *B. influenzae* (Gripe espanhola) se manifestou inicialmente nas tropas aliadas das cidades de Rouen e Wimereux na França em abril de 1918. Este surto foi inicialmente tratado como se fosse uma gripe comum. Não parecia existir uma razão para se pensar em uma epidemia. Porém, ao contrário do que se imaginava em maio a doença se difundiu ao restante do exército¹⁰³.

Segundo a comissão instituída para pesquisar a doença nos campos de batalha na França, o número de infectados registrado durante o mês de maio, foi de aproximadamente 250 por dia. No mês de junho o número de infectados foi de 150 por dia e de agosto 50 diários¹⁰⁴.

A explicação dada por alguns médicos, do período, foi de que os bacilos tinham se tornado mais virulentos, e dadas às condições da guerra ocorreu seu crescimento, disseminação, e propagação rápida pela Europa. Esta iniciou-se pela Espanha, França, Itália, Alemanha e Inglaterra, e em seguida pelo mundo¹⁰⁵.

Os sintomas na maioria dos casos consistiam em febre alta, entre 39°C a 43°C, dores lombares e fortes dores de cabeça nos primeiros três dias da doença. Após esse período, surgiam complicações nas regiões dos brônquios e pulmões como a pneumonia, bronquite e broncopneumonia, sendo a morte por insuficiência respiratória em aproximadamente sete dias¹⁰⁶.

¹⁰¹ Na época os pesquisadores consideravam se tratar de uma bactéria (bacilo), pois não podiam visualizar um vírus em microscópio, e nem filtrá-lo, só era possível detectar a sua presença. (Daniel J. Kevles, *Histórias esquecidas da Ciência*, 65).

¹⁰² Birch, "Alexander Fleming", 32.

¹⁰³ "A report n the influenza epidemic in the British Armies in France, 1918". *The British Medical Journal* 2(1918):505-509, na p.505.

¹⁰⁴ *Ibid.*

¹⁰⁵ *Ibid.*

¹⁰⁶ *Ibid.*, p. 506.

Diante da rapidez do contágio e escassez no tempo para tratamento dos doentes foi solicitado aos bacteriologistas que trabalhavam nos hospitais da França uma pesquisa sobre a natureza infecciosa dessa doença¹⁰⁷.

Foi solicitado aos bacteriologistas, que trabalhavam na guerra, que pesquisassem o microrganismo. Fleming utilizou para seu estudo, culturas deste organismo, obtidas a partir do escarro das pessoas doentes. Esse material foi colhido da entrada da boca e nasofaringe. Este procedimento pareceu ter sido o mais bem sucedido, ele permitia a obtenção de secreções faríngeas de saliva traqueal fresca com traços de sangue, que depois eram colocadas em placas de Agar para cultura. Fleming verificou que o aquecimento das culturas acima de 55°C provocava um crescimento do organismo mais rápido. Contudo esse método tinha desvantagens: a hemoglobina era destruída e a placa se tornava opaca.

Para manter as culturas, a maioria dos pesquisadores recomendava que as placas permanecessem em temperatura ambiente por quarenta e oito horas¹⁰⁸.

Após o desenvolvimento das pesquisas de Fleming e outros para identificar a origem dessa epidemia, foi mostrado que o *B. influenzae* se encontrava com muita freqüência no trato respiratório das pessoas, mas não era comum em pessoas que estivessem convalescendo da gripe. O *B. influenzae* só foi encontrado no sangue dos pacientes durante essa epidemia. Quando no escarro das pessoas havia sangue, isso era acompanhado de complicações como pneumonia e meningite¹⁰⁹.

Procurou se observar como o sistema imunológico das pessoas afetadas pela gripe reagia.

As observações feitas indicavam a idéia de que o *B.influenzae* fosse a causa do problema. O desenvolvimento súbito da atividade fagocitária nas mucosas do trato respiratório levava à melhoria do paciente e diminuição do escarro. Pensava-se, nesse período, que uma das dificuldades em não atribuir ao *B. influenzae* a responsabilidade da epidemia no início dos casos fosse a

¹⁰⁷ “A report n the influenza epidemic in the British Armies in France, 1918”, p.506.

¹⁰⁸ *Ibid.*, p. 507.

¹⁰⁹ *Ibid.*, p. 509.

falta de secreções reativas, devida ao trabalho dos fagócitos na membrana da traquéia e brônquios¹¹⁰.

3.5 Algumas considerações

Neste capítulo vimos que durante o período da Primeira Guerra Mundial houve graves problemas em relação ao tratamento de feridas infectadas.

Os experimentos com a utilização de substâncias hipertônicas salinas, realizados por Wright e Fleming, mostravam sua eficácia no tratamento de feridas. Esse tipo de tratamento aumentava o fluxo de fagócitos nos ferimentos, possibilitando a recuperação de forma mais natural. Para auxiliá-lo Fleming realizava experimentos para averiguar a eficácia do novo tratamento, concordando com ele.

A utilização de anti-sépticos químicos era defendido pelo bioquímico Henry Drysdale Dakin, que também realizou experimentos e pesquisas procurando detectar sua eficácia no tratamento das feridas.

Vimos também que Fleming, no final da guerra realizou pesquisas bacteriológicas para detectar a origem da epidemia do *B. influenza*, que se alastrou pela Europa.

No próximo capítulo trataremos da imunologia natural.

¹¹⁰ A report n the influenza epidemic in the British Armies in France, 1918”, p. 509.

CAPÍTULO 4

FLEMING E OS ESTUDOS SOBRE A LISOSIMA

Este capítulo tratará das pesquisas do zoólogo Élie Metchnikoff (1845-1915), sobre imunologia natural no que se refere às funções mecânicas que ele atribuía a saliva, lágrima e mucosa. Além disso, abordará as investigações de Fleming sobre a lisosima, uma enzima descoberta por ele, encontrada nas secreções e em quase todos os órgãos humanos. A lisosima tem a capacidade de dissolver e matar microrganismos.

4.1 Retorno ao Hospital *St. Mary* após a guerra

Com o final da guerra e a diminuição dos casos de *B. influenzae*, Fleming retornou à Inglaterra em janeiro de 1919, para o Departamento de Inoculação do hospital *St. Mary*. No período pós-guerra, o hospital encontrava-se sem condições de atendimento, pois não havia um número suficiente de estudantes para manter o seu funcionamento. O Comitê Universitário Inglês havia proposto que se fosse mantido apenas o curso de pós-graduação¹¹¹.

Para restabelecer as funções do hospital *St. Mary* os poucos recursos financeiros disponíveis foram utilizados na compra de leitos novos. Os pacientes começaram a procurar os serviços médicos dos estudantes, da escola de medicina na enfermaria, autorizados pelo conselho da cidade de Paddington. Estudantes do Hospital e maternidade Charlotte, foram convidados a trabalharem na área de obstetrícia, e para melhorar o quadro profissional, professores de medicina e cirurgia da Universidade de Londres foram contratados. Nesse período, o hospital escola *St. Mary* passou a ter mulheres em seu quadro de estudantes em medicina¹¹².

Fleming nesse mesmo ano foi promovido a diretor assistente do Departamento de Inoculação, trabalhando com Wright nas teorias sobre

¹¹¹ Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin", p.351.

¹¹² *Ibid* p. 353.

imunidade desenvolvidas no Instituto Pasteur. A vacina terapica possuía uma nova configuração. Wright sugeriu que fossem adicionados ao sangue microrganismos para que os leucócitos fossem estimulados a produzir anticorpos. Caso o sangue fosse utilizado em transfusões, poderia curar o paciente de sua infecção. A esse novo procedimento deu o nome de “imunotransfusão”. Essa pesquisa não teve os resultados esperados, mas apesar disso, Wright não desistiu de sua idéia¹¹³.

4.2 A Imunologia natural de Élie Metchnikoff

Em 1905, o zoólogo russo, Metchnikoff publicou seu livro onde definiu o conceito de imunidade para doenças infecciosas. Além disso, apresentou seus estudos sobre o processo de defesa da pele e membrana mucosas contra microrganismos.

Segundo Metchnikoff, a imunidade contra doenças infecciosas devia ser entendida como o grupo de fenômenos em que um organismo é capaz de resistir ao ataque dos microrganismos que produzem doenças. Essa resistência poderia ser de dois tipos: metabólica sem intervenção direta do homem ou adquirida através do resultado da cura espontânea.

No processo natural de imunidade a infecções, Metchnikoff realizou observações sobre a fagocitose, processo em que certas células do corpo, os fagócitos são capazes de englobar e digerir corpos estranhos ao organismo, favorecendo uma defesa natural contra microrganismos. Sobre esse processo ele assim se expressou:

Os fatos nos oferecem um quadro geral dos fenômenos apresentados na imunidade natural contra microrganismos. O recurso dominante é representado pela ação fagocitária observada em toda a série de animais, e que é exercido contra parasitas pertencentes a todos os grupos microbianos. Os

¹¹³ Hare, “The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin”, p. 351.

fagócitos realizam uma luta contra o microrganismo e livram o organismo animal sem exigir qualquer ajuda dos fluidos do corpo. A fagocitose é exercida contra microrganismos virulentos e é suficiente para garantir a imunidade natural¹¹⁴.

Em suas observações, Metchnikoff classificou os glóbulos brancos que realizam a ação fagocitária nos vertebrados em dois grupos: macrófagos e micrófagos. Os macrófagos são células do sangue e linfa e que estão intimamente relacionadas aos órgãos como o baço, glândulas linfáticas e medula óssea atuando em doenças crônicas como tuberculose e hanseníase. Os micrófagos são células menores que possuem melhor desempenho em doenças menos virulentas¹¹⁵.

Metchnikoff atribuía a imunidade de um organismo ao trabalho que os fagócitos distribuídos pelo corpo realizavam. Em sua pesquisa com macrófagos afirmou que a função bactericida permanecia nos órgãos dessas células e não nos tecidos e fluidos corporais¹¹⁶.

Em seus estudos sobre o fenômeno da imunidade natural, não introduziu os microrganismos no sangue ou nos tecidos por meio de seringas ou outro instrumento. Para Metchnikoff, a infecção poderia ocorrer quando a pele e a mucosa, tecidos que oferecem resistência, fossem destruídos permitindo assim a entrada de microrganismos¹¹⁷.

Metchnikoff descreveu a forma de como a pele e as mucosas se defendem contra a entrada dos microrganismos em seu livro *Immunity infective diseases*, como também a reação dos fagócitos após a invasão.

De acordo com o autor, a camada mais externa da epiderme (córnea) está constantemente eliminando células mortas. Os microrganismos quando se instalam na pele são eliminados juntamente com essas células¹¹⁸.

O tecido conjuntivo da pele humana também seria capaz de se defender. Para Metchnikoff, isso ocorria durante a penetração de um parasita. Nesse

¹¹⁴ Élie Metchnikoff, *Immunity in infective diseases* (London, Cambridge University Press, 1905):206.

¹¹⁵ *Ibid.*, p. 547-549.

¹¹⁶ *Ibid.*, p. 187.

¹¹⁷ *Ibid.*, p. 404.

¹¹⁸ *Ibid.*, p. 404.

caso se configurava um espessamento do tecido fibroso, um efeito do foco microbial. Os macrófagos locais e os fagócitos móveis seriam mobilizados através da epiderme, apesar da ausência linfática e depois dos microrganismos expulsos o epitélio subjacente produziria camadas epidérmicas para reposição do tecido¹¹⁹.

Como a pele, as mucosas são revestidas por uma camada de epitélio, que tem como função impedir a entrada de microrganismos. Entretanto, a pele normal é seca e a mucosa sempre é úmida, uma condição favorável à multiplicação de agentes patogênicos. As regiões onde as mucosas, são mais expostas ao contato com o ar e objetos externos, seriam suscetíveis a um número maior de organismos tais como: estafilococos, pneumococos e estreptococos¹²⁰.

Metchnikoff iniciou os estudos sobre a membrana das mucosas com a conjuntiva ocular e cavidade nasal. Ressaltou que no momento do nascimento a conjuntiva ocular poderia ser infectada durante o parto, pois entra em contato com a membrana da mucosa vaginal entrando em contato com alguns de seus microrganismos, tanto inofensivos como patogênicos.

Alguns pesquisadores do período pensavam que as lágrimas, além de sua ação defensiva mecânica, pudessem ter ação bactericida e fossem capazes de destruir microrganismos através dos sais minerais nelas dissolvidos. Outros defendiam a transferência dos microrganismos da conjuntiva ocular para a cavidade nasal e dela para o exterior, eliminando assim o microrganismo.

Após esses estudos, Metchnikoff concluiu qual seria a função das lágrimas. Ele explicou:

As lágrimas devem cumprir a função de evitar o perigo resultante da proximidade e da presença de microrganismos na cavidade em geral.

Em todos os casos observados é incontestável que a parte mecânica desempenhada pelas lágrimas é a mais importante

¹¹⁹ Metchnikoff, *Immunity in infective diseases*, p. 406-407.

¹²⁰ *Ibid.*

defesa oferecida pela conjuntiva dos olhos contra a invasão de microrganismos. Esta defesa nem sempre é eficaz como se tem visto com frequência em conjuntivites¹²¹.

Para Metchnikoff, como já foi salientada, a conjuntiva ocular retira os microrganismos mecanicamente, e os envia do ducto lacrimal para a cavidade nasal e esta apresenta um processo semelhante para a sua defesa.

Os resultados de suas pesquisas confirmaram a hipótese de que a ação de defesa da mucosa nasal contra microrganismos, era efetuada pela eliminação mecânica. Os organismos depositados eram expulsos juntamente com o muco nasal, que não possuía propriedades bactericidas, auxiliados pelos movimentos vibratórios dos cílios das células que compõem essa mucosa.

Apesar dessa defesa dupla, muitos microrganismos conseguiam ultrapassar esses obstáculos e se instalavam nos brônquios e pulmões. Os macrófagos, também encontrados em glândulas, para realizarem a retirada dos organismos patogênicos, eram enviados para esse local¹²².

A proteção do sistema digestório teria maior complexidade do que as passagens respiratórias. Segundo Metchnikoff, a cavidade bucal apresentava maior suscetibilidade à invasão de microrganismos, pois juntamente com o ar e alimentos, possuía uma flora bacteriana muito rica.

Alguns estudiosos do período aceitavam a idéia de que a saliva tivesse poder bactericida quando se confrontava com a rápida cicatrização de feridas na boca. Após análise em laboratório, percebeu-se que a saliva não destruía os microrganismos instalados na cavidade bucal. Metchnikoff descreveu a função da saliva dessa maneira:

A saliva que é impotente como anti-séptico, tem importante função de erradicar da boca microrganismos de forma mecânica. As secreções da parótida e das outras glândulas salivares

¹²¹ Metchnikoff, *Immunity in infective diseases*, p. 409.

¹²² *Ibid.*, p. 413.

enfraquecem as bactérias e as carregam da cavidade faríngea até o estômago. A saliva ainda é útil para diluir os detritos alimentares e prevenir sua estagnação e decomposição na cavidade bucal¹²³.

Para o pesquisador a saliva exercia uma atração sobre os leucócitos próximos da cavidade bucal, encontrados nas amígdalas e glândulas. Esse fato explicaria a rápida regeneração das lesões ocorridas na boca¹²⁴.

Outro fator importante para a proteção da cavidade buco-faríngea seria a sua cobertura epitelial. Tal como na superfície da pele, as células do revestimento externo estariam em constante descamação, aumentada especialmente durante a mastigação. Após cada refeição haveria uma renovação parcial da superfície do revestimento bucal, e durante os intervalos alimentares, as células epiteliais levariam os microrganismos para o estômago, para destruí-los pelo suco gástrico¹²⁵.

O meio ácido desse reservatório era uma barreira contra microrganismos e impediria a putrefação dos alimentos ingeridos. A partir dessa observação, foi inferida a ação anti-séptica a esse suco. Pesquisas comparativas no período feitas com soluções aquosas de ácido clorídrico indicavam que a ação bactericida do suco gástrico dependia unicamente da quantidade desse ácido.

Nos intestinos, local que não consistia em um meio ácido, havia sido encontrado um número menor de microrganismos, Metchnikoff atribuiu esse resultado a uma limpeza mecânica, desenvolvida pelos movimentos peristálticos do canal digestivo¹²⁶.

Os órgãos digestivos seriam equipados com aparelhos defensivos contra microrganismos. Isso acarretava um acúmulo de tecido linfóide sob a forma de fragmentos ou de glândulas individuais: as amígdalas e a glândula linfática do intestino. Estes órgãos, segundo Metchnikoff, produziam um grande número de fagócitos, que seriam capazes de entrar em contato com os microrganismos e

¹²³ Metchnikoff, *Immunity in infective diseases*, p. 416.

¹²⁴ *Ibid.*, p. 416.

¹²⁵ *Ibid.*, p. 417.

¹²⁶ *Ibid.*, p. 422.

os destruir. O acúmulo de fagócitos nos órgãos linfóides do canal digestivo constituía assim a última barreira de defesa da mucosa dessa cavidade¹²⁷.

Na defesa natural da mucosa vaginal, Metchnikoff referiu-se aos estudos sobre a “autopurificação” da vagina, indicando que essas membranas de constituição parecida com as outras mucosas já mencionadas, tivessem a capacidade de expulsar de forma mecânica, pequenas partículas e microrganismos, através da descamação e expulsão juntamente com as secreções fluidas, e o teor ácido da membrana da vagina e da vulva poderia desempenhar papel protetor contra bactérias que não toleram esse meio.

Ao concluir o estudo que realizou sobre a imunidade da pele e das membranas, Metchnikoff se expressou dessa forma:

A natureza não usa anti-sépticos para proteger a pele e a membrana mucosa. Os fluidos que umedecem a superfície da boca e de mucosas não têm caráter bactericida. A natureza livra as mucosas e a pele de um grande número de microrganismos por descamação das células epiteliais e as expulsa juntamente com as secreções fluidas e excreções. A natureza, como os médicos que substituem os anti-sépticos por soluções salinas para lavagem da boca, intestino e outros órgãos, também utiliza esse método mecânico. Ela conta com a ajuda de microrganismos inofensivos para impedir a permanência de microrganismos patogênicos nestes locais, e é constantemente enviado para as mucosas e pele um exército de fagócitos móveis que livram essas regiões de microrganismos¹²⁸.

O pesquisador russo atribuía aos glóbulos brancos, através da fagocitose, a capacidade de proteger os organismos contra os microrganismos. Regiões onde essas células não se encontravam como a pele e as membranas mucosas, o processo de defesa era realizado por meio mecânico: movimentos

¹²⁷ Metchnikoff, *Immunity in infective diseases*, p. 428.

¹²⁸ *Ibid.*, p. 432.

dos cílios das células, a lavagem por meio das lágrimas e saliva e a descamação da pele.

A visão de Metchnikoff, sobre a ação mecânica das secreções como um dos fatores da imunologia natural, foi seguida até 1921, quando Fleming observando muco nasal, descobriu a lisosima.

4.2 Estudos de Fleming sobre a Lisosima

Em novembro de 1922, Fleming registrou em seu caderno de anotações dados sobre sua primeira pesquisa original. Esta dizia respeito a um anti-séptico natural, posteriormente chamado de lisosima¹²⁹.

Segundo Victor Douglas Allison (1879-1966), assistente de Fleming no Departamento de Inoculação do *St. Mary*, no período de 1922 a 1925, ele pesquisava em seu laboratório a ação de alguns anti-sépticos em tecidos infectados por microrganismos¹³⁰.

Sua bancada não era limpa diariamente e as placas de cultura acumulavam-se, por duas ou até três semanas (fig. 4.2.1). Em uma noite, ao descartar suas culturas, notou que uma placa contaminada por seu muco nasal há algumas semanas, estava coberta por colônias de bactérias de forma esférica, de cor amarelo ouro opaco, de aparência inofensiva. Ele imaginou que isso fosse decorrente do ar ou poeira do próprio laboratório ou que havia entrado pela janela¹³¹.

Como descreveu Allison, Fleming percebeu que sobre a placa, próximo ao muco nasal não ocorria o crescimento de bactérias, e na outra parte da placa as colônias tinham se tornadas vítreas, translúcidas e inertes. No início ele pensou que algo tinha se fundido ao muco nasal para impedir os germes de crescerem próximo a ele muco e além desta zona matar e dissolver as bactérias.

¹²⁹ Birch, *Alexander Fleming*, 33.

¹³⁰ V.D. Allison, "Personal recollections of Sir Almroth Wright and Sir Alexander Fleming", *The Ulster Medical Journal*, 43(1974):89-98, na p.91.

¹³¹ *Ibid.* Esta é uma das três versões sobre o ocorrido. Duas delas concordam que o muco nasal examinado pertencia a Fleming. A outra considera que o muco nasal pertencia a um paciente do Hospital *St. Mary*.



Fig. 4.2.1 Bancada de pesquisa de Fleming. Ronald Hare, "New light on the history of Penicillin", *Medical History*, 26(1982): 8.

A próxima etapa de Fleming foi testar o efeito do muco nasal fresco sobre o germe. Ele preparou uma suspensão opaca amarela salina com o germe, adicionando um pouco de muco nasal. Em menos de dois minutos a suspensão tornou-se clara e as bactérias tinham sido completamente dissolvidas (fig. 4.2.2). Em seguida verificou o efeito das lágrimas com o germe da suspensão, e o resultado foi de que em menos de um minuto o germe havia sido dissolvido¹³².

¹³² Allison, "Personal recollections of Sir Almroth Wright and Sir Alexander Fleming", p.91.

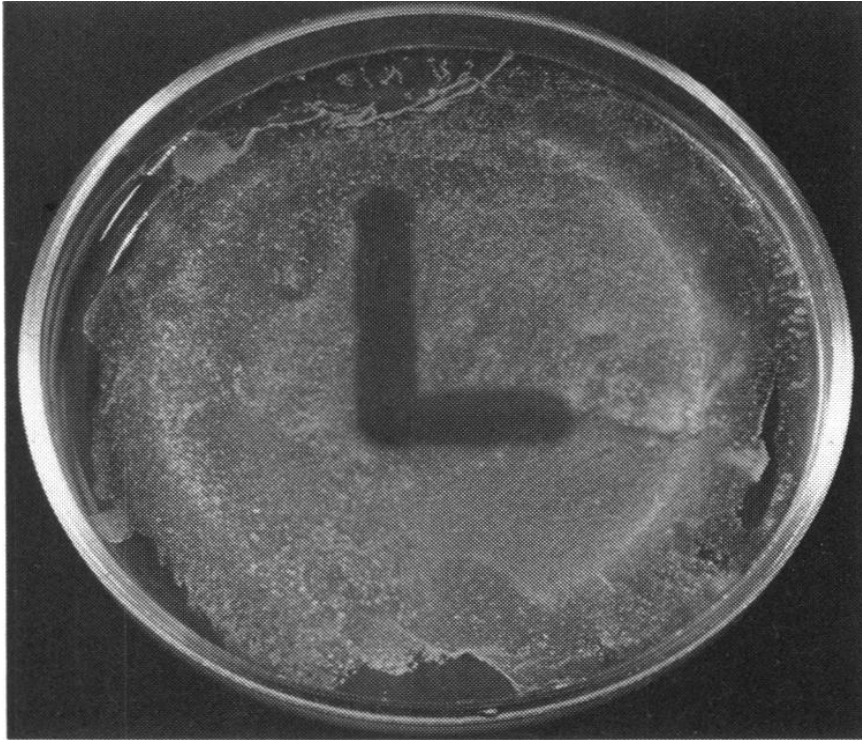


Fig. 4.2.2. Lise ocorrendo em uma placa de cultura com colônias de microrganismos sob a ação da lisosima. Ronald Hare, "The scientific activities of Alexander Fleming, other than the discovery of Penicillin", *Medical History Journal*, 27(1983):358.

Fleming solicitou a Wright que o auxiliasse a nomear a nova substância. Utilizando-se de raízes gregas, como essa substância possuía propriedades de uma enzima considerou que seu nome deveria terminar com "zyme" e como dissolvia certos micróbios, "lyse". Ficou acordado que o nome seria lisosima, e a bactéria esférica *Micrococcus lysodeikticus*, por ser facilmente observada durante a dissolução¹³³.

Em dezembro de 1921, Fleming apresentou sua pesquisa no *Medical Research Club*. Entretanto, não houve o interesse dos membros presentes, que provavelmente não perceberam sua importância. Na realidade se tratava de uma pesquisa inicial. Fleming só havia testado o *Micrococcus lysodeikticus* e algumas bactérias mais agressivas. Porém sobre as últimas a substância não teve efeito destrutivo¹³⁴.

¹³³ Allison, "Personal recollections of Sir Almroth Wright and Sir Alexander Fleming", p.92

¹³⁴ *Ibid.*

Com o auxílio de Allison e outros assistentes, Fleming, deu prosseguimento à suas pesquisas sobre a lisosima no corpo humano, nos animais e vegetais. Eles utilizaram nos tecidos, secreções e excreções, a bactéria *Micrococcus lysodeikticus*. Isso porque ela era capaz de detectar quantidades mínimas da substância lítica nos materiais que foram testados, diferentemente dos outros organismos que eles utilizaram para essas observações¹³⁵.

Segundo Fleming, o princípio lítico da nova enzima estaria presente em todos os tecidos humanos examinados e em muitas secreções, exceto em urina, suor e fluído cérebro-espinhal. A concentração variava muito, e ele mostrou em uma tabela (fig. 4.2.3) a lisosima relativa contida em alguns tecidos e fluidos do corpo.¹³⁶

| Material examined. | H.D. | Material examined. | H.D. |
|-------------------------|----------|--------------------|------------|
| Synovial fluid .. | 1 in 80 | Liver | 1 in 400 |
| Blood serum .. | " 80 | Tonsil | " 400 |
| Pleural effusion | " | Kidney | " 100 |
| (clear) | " 80 | Intestino .. | " 500 |
| Ascitic fluid .. | " 50 | Stomach .. | " 1000 |
| Ovarian cyst fluid | " 10 | Meninges .. | " 400 (b) |
| Fluid from parotid cyst | " 100 | Skin | " 100 (c) |
| Seimen | " 20 (a) | Cartilage .. | " 1300 (d) |

Fig. 4.2.3 H.D. Maior diluição determinando a lise completa do *M. lysodeikticus* em uma hora a 45°C.

(a) Lise parcial depois de três horas; (b) lise quase completa; (c) lise incompleta; (d) em cinco minutos. Alexander Fleming, "Lysozyme: A bacteriolytic ferment found normally in tissues and secretions", *The Lancet*, 204(1929):217.

De todos os tecidos estudados, os cartilagosos possuíam a maior concentração da enzima. Em uma parte de cartilagem para 1300 partes de solução salina normal houve a dissolução completa da bactéria em 5 minutos. Os fluidos de alguns indivíduos também foram testados para medir a concentração da substância (fig. 4.2.4)¹³⁷.

¹³⁵ Allison, "Personal recollections of Sir Almroth Wright and Sir Alexander Fleming", p.92

¹³⁶ Alexander Fleming, "Lysozyme: A bacteriolytic ferment found normally in tissues and secretions", *The Lancet*, 204(1929):217-220, na p.217.

¹³⁷ *Ibid.*

| Fluid examined. | H.D. | Fluid examined. | H.D. |
|-----------------|----------|-----------------|-------------|
| Blood serum .. | 1 in 270 | Sputum | 1 in 13,500 |
| Tears | " 40,000 | Saliva | " 300 |
| Nasal mucus .. | " 13,500 | | |

Fig. 4.2.4. H.D. Maior diluição determinando a lise completa em teste com bactérias do gênero cocos em uma hora a 45°C. Alexander Fleming, "Lysozyme: A bacteriolytic ferment found normally in tissues and secretions", *The Lancet*, 204(1929):217.

Fleming observou que a concentração de lisosima nas lágrimas era muito grande. Em um experimento, para verificar a procedência da lisosima em lágrimas, as glândulas lacrimais foram induzidas e depois as lágrimas retiradas. As células das glândulas lacrimais foram capazes de produzir lisosima rapidamente e em alta concentração, que ele justificou como sendo provenientes dos fluidos sanguíneos¹³⁸.

Para a verificação da lisosima em leucócitos, Fleming utilizou lâminas de com sangue. Após a coagulação, o coágulo foi retirado junto com o soro, permanecendo somente os leucócitos na lâmina. Depois foram introduzidas colônias de *Micrococcus lysodeikticus*, e em uma hora esses microrganismos foram dissolvidos. Com esse experimento, Fleming concluiu que os leucócitos poderiam apresentar a concentração de lisosima semelhante aquela das lágrimas¹³⁹.

Os órgãos e secreções de alguns animais foram testados por Fleming. As lágrimas dos coelhos, cavalos, carneiros e perus eram 30 vezes menos potentes que as lágrimas dos seres humanos. Órgãos de cachorros, coelhos e cobaias também produziam lisosima, mas em pequena concentração. Nos ovos de aves em que pesquisou, ocorria à presença de lisosima apenas na clara e esta se diferenciava entre as espécies, e a gema não apresentava efeito lítico.

Ao mesmo tempo em que *Micrococcus lysodeikticus* foi utilizado com finalidade experimental, por ser a mais sensível das bactérias, foram observados outros microrganismos filtrados do ar do laboratório. De uma

¹³⁸ Fleming, "Lysozyme: A bacteriolytic ferment found normally in tissues and secretions", p.217.

¹³⁹ *Ibid.*, p.218.

seqüência de 104 organismos utilizando-se a lisosima da saliva, 75% foram dissolvidas rapidamente e 28% dissolvidas em uma hora¹⁴⁰.

Com bactérias isoladas do corpo humano, os resultados se mostraram muito variáveis, principalmente com microrganismos resistentes. A lisosima diluída de lágrimas exercia uma ação bactericida inibitória nos experimentos realizados. Outros fluidos do corpo não tiveram a mesma ação que as lágrimas, Fleming sugeriu que essas diferenças poderiam estar relacionadas ao poder imunitário de alguns tecidos para certas infecções¹⁴¹.

Nesse período, Allison, assistente de Fleming, pesquisava a ação de certos anti-sépticos como o Eusol, Cloramina T, Iodo, Ácido carbólico e Flavine e os comparava com a ação bacteriolítica das lágrimas e outras secreções. Ele desejava verificar a capacidade inibitória de crescimento dos microrganismos. Esse procedimento consistia em diluir os anti-sépticos em soluções salinas e adicionar bactérias do gênero estafilococos em cada uma dessas diluições e em mesmas proporções, secreções contendo lisosima e adicionado cocos.

Após esse estudo, Fleming verificou que as lágrimas teriam um efeito bactericida maior que os anti-sépticos químicos, impedindo o crescimento dos estafilococos nos experimentos realizados¹⁴². Ele explicou:

Quando comparamos os poderes dos anti-sépticos naturais do corpo com os anti-sépticos químicos, somos inclinados a acreditar que os primeiros são ineficazes. Possivelmente isto ocorre porque no passado os testes da maioria dos anti-sépticos químicos foram realizados sob condições favoráveis, enquanto que o teste dos agentes bactericidas presentes normalmente no corpo foram realizados em condições desfavoráveis. Nos experimentos com os anti-sépticos químicos e a lisosima não houve condições desfavoráveis¹⁴³.

¹⁴⁰ Fleming, "Lysozyme: A bacteriolytic ferment found normally in tissues and secretions", p. 218.

¹⁴¹ *Ibid.*, p.218.

¹⁴² *Ibid.*, p.219.

¹⁴³ *Ibid.*, p. 220.

Segundo Fleming, a ação bacteriolítica da lisosima não era manifestada igualmente em todas as bactérias. Os melhores resultados foram com os microrganismos de menor virulência para o ser humano.

A grande concentração de lisosima em certos tecidos e secreções, como os olhos, o nariz e o trato respiratório, indicava que essas regiões eram particularmente mais expostas a infecções ou que necessitava de recursos para sua proteção, pois estão constantemente expostas a organismos encontrados no ar¹⁴⁴.

Em seus estudos sobre a lisosima, Fleming pode observar que a nova substância não poderia ter sua capacidade de dissolver microrganismos aumentada através de vacinas, pois como era um mecanismo da imunidade natural, não poderia ser adquirida¹⁴⁵.

4.3 Algumas considerações

Vimos que, no período Wright e Fleming, seguiam os estudos sobre imunologia de Metchnikoff: como a função dos fagócitos, leucócitos e outros glóbulos brancos na eliminação de microrganismos e as defesas da pele e mucosas.

Com a descoberta de uma enzima capaz de dissolver microrganismos de ação menos patogênica, Fleming observou que a ação bactericida dos tecidos e secreções deveria ser considerada um fator importante na imunidade natural.

Entretanto, como a lisosima não era eficaz contra microrganismos mais virulentos, não se atribuiu muita importância a ela na época.

¹⁴⁴ Fleming, "Lysozyme: A bacteriolytic ferment found normally in tissues and secretions", p. 218.

¹⁴⁵ *Ibid.*

CAPÍTULO 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como explicamos inicialmente, o objetivo desta pesquisa era descrever as investigações iniciais de Fleming que conduziram à descoberta da lisosima. Ou seja, qual o caminho percorrido por ele até chegar à lisosima.

A lisosima é uma enzima produzida pelos seres vivos (animais e vegetais) que age como uma barreira contra os microrganismos presentes no ar. Trata-se então de uma contribuição relevante para o estudo da imunologia natural dos seres vivos.

A presente análise mostrou que desde o início de sua carreira, a principal preocupação de Fleming foi investigar os microrganismos que produziam doenças com o intuito de promover a cura dos pacientes.

Percebemos que desde o início de sua carreira, Fleming trabalhou com Almroth Edward Wright no Instituto de Inoculação do Hospital *St. Mary*, em Paddington. A princípio investigou a origem da *Acne vulgaris*, nome que deu tanto à doença como ao bacilo que a produzia. Conseguiu não apenas identificar e isolar os microrganismos causadores dessa doença, como também melhorar a vacina que havia sido desenvolvida por Wright.

Na seqüência dedicou-se ao estudo da sífilis. Nesse sentido, aperfeiçoou o teste que era empregado na época para detectar a doença, o teste de Wassermann. Fleming ao invés de utilizar fígado de fetos abortados de mulheres infectadas pela sífilis empregou pequenas porções de coração humano ou cobaias infectadas.

Esse método, utilizado em torno de 1909, tinha um custo menor e oferecia maior precisão. Dessa maneira, era possível saber qual a dosagem de mercúrio necessário para o tratamento, proporcionando a utilização de dosagens menores e reduzindo os riscos do tratamento.

Por volta de 1911, para o tratamento da sífilis era empregado o SALVARSAN (salvo pelo arsênico). Nesse sentido, Fleming concebeu um aparato que possibilitava a administração do medicamento por via intravenosa.

Com o advento da Primeira Guerra Mundial (1914-1918), Fleming se dedicou à investigação de ferimentos de guerra infeccionados. Juntamente com Wright propôs a utilização de soluções hipertônicas salinas. Desenvolveu uma série de experimentos que indicavam que os anti-sépticos químicos eram prejudiciais, pois causavam a destruição do tecido humano.

Outro objetivo de estudo de Fleming foi à busca do microrganismo causador da gripe espanhola, então chamado de *Bacillo influenzae*. Entretanto, tais pesquisas na época, não trouxeram resultados esclarecedores sobre o assunto.

Dando prosseguimento as suas investigações bacteriológicas sobre ferimentos infectados, Fleming detectou em uma placa de muco nasal uma substância que tinha a capacidade de destruir e dissolver microrganismos. Constatou sua presença em uma série de tecidos animais e vegetais. Testou sua ação sobre microrganismos mais virulentos, constatando que, nesses casos, sua ação ficava enfraquecida.

A partir da análise da lágrima e saliva, aventou a hipótese de que a mucosa dos olhos, nariz e boca por estarem mais expostas à ação do meio ambiente, seriam protegidas contra infecções por essa enzima. Assim, a lisosima faria parte da imunidade natural.

A contribuição de Fleming nesse sentido foi relevante e mudou a concepção que se aceitava na época. Esta concepção era adotada por Élie Metchnikoff, e admitia que lágrimas, saliva e muco nasal, desempenhavam apenas a função mecânica de lavagem e eliminação de microrganismos da cavidade ocular, região nasal e trato respiratório.

Pode-se dizer que, ao contrário das contribuições anteriores à lisosima, que resultaram de um trabalho coletivo em que Wright desempenhou um papel importante, a descoberta da lisosima foi uma contribuição original de Fleming. Não podemos dizer que toda a experiência e treinamento que Fleming teve anteriormente não tenham auxiliado, pois a descoberta e desenvolvimento da hipótese da ação da lisosima foram contribuições pessoais de Fleming. Wright contribui apenas em nomear a enzima e microrganismos utilizados nos testes.

Desta maneira podemos concluir que, a pesquisa que Fleming realizou em bacteriologia entre 1908 a 1921, em busca de um anti-séptico que destruísse microrganismos, possibilitou-lhe reconhecer em 1921 a lisosima.

BIBLIOGRAFIA

- A REPORT on “The influenza epidemic in the British Armies in France, 1918”.
The British Medical Journal, 2(1918):505-509. Disponível em <http://www.pubmed.gov>.; Internet; acesso em 18 de junho de 2009.
- ABRAHAM, J. Johnston. “Some account of the history of the treatment of syphilis”. *The British Journal Venereal Diseases*, 24 (4, 1948): 153-160. Disponível em <http://www.pubmed.gov>.; Internet; acesso em 10 de novembro de 2008.
- ALLISON, Victor Douglas “Personal recollections of Sir Almroth Wright and Sir Alexander Fleming”. *The Ulster Medical Journal* 43 (1974):89-98. Disponível em <http://www.pubmed.gov>.; Internet; acesso em 23 de setembro de 2008.
- BIRCH, Bervely. *Personagens que mudaram o mundo* (Trad. Eliana Rocha, Título original “Alexander Fleming”, Exley Publications Ltd., Watford, 1990) Rio de Janeiro: Editora Globo, 1993.
- BRAGA, M.B. *Os Homens que mudaram a humanidade*, Rio de Janeiro: Editora Três, 1975.
- BRITISH Library, Beautiful Minds. “Alexander Fleming (1881-1955): A noble life in science”. *British Library on line*. Disponível em <http://www.bl.uk/onlinegallery> ; acesso 04 abril 2007.
- BRITISH Library, Beautiful minds: “Alexander Fleming”. *British Library on line*. Disponível em <http://bl.uk/onlignallery/features/beautifulminds/Fleming.html>; acesso em 6 de abril 2007.
- CASTRO, Josué de. *Três personagens*, Rio de Janeiro: Ed. da Casa do Estudante do Brasil, 1955.
- COLEBROOK, Leonard. “Almoroth Wright – Pioneer in immunology”. *British Medical Journal* 2 (1953): 635-640. Disponível em <http://www.pubmed.gov>; Internet; acesso em 23 janeiro de 2008.
- COPE, Zachary. “The treatment of wounds through the ages”. *The Medical History Journal* 3 (1958): 163-174. Disponível em <http://www.pubmed.gov>.; Internet; acesso em 13 de julho de 2008.

- DAKIN, Henry Drysdale. "On the use of certain antiseptic substances in the treatment of infected wounds". *The British Medical Journal* 1 (1915): 318-320. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 20 de abril de 2008.
- DAKIN, Henry Drysdale. "The antiseptic action of hypochlorites". *The British Medical Journal* 2 (1915): 809-810. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 20 de abril de 2008.
- DAKIN, Henry Drysdale. "Biochemistry and war problems". *The British Medical Journal* 1 (1917): 833-837. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 20 de abril de 2008.
- DOLMAN, Claude E. "Fleming, Alexander", Gillispie, Charlton Coulston (org), *Dictionary of Scientific*, vol.III:28-31, New York: Charles Scribner's Sons, 1981.
- EHRlich, Paul. International Medic Congress Chemotherapy. *The British Medical Journal*. 1 (1913): 353-359. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 10 novembro de 2007.
- ENCYCLOPEDIA Britannica, "Élie Metchnikoff", *Encyclopedia Britannica OnLine*, s.v. Disponível em [http:// www.britannica.OnLine.com](http://www.britannica.OnLine.com). Internet acesso em 06 de outubro 2008.
- FERREIRA, Renata Rivera & Roberto de Andrade Martins. "Os estudos de Pasteur sobre os bichos da seda e a Gênese da Teoria microbiana das doenças". *Perspicillum* (1997): 113-175.
- FERREIRA, Renata Rivera & Roberto de Andrade Martins. "Primórdios da moderna teoria dos germes: Agostino Bassi e a doença dos bichos-da-seda". *Episteme* (1997): 55-71.
- FLEMING, Alexander. "A simple method of serum diagnosis of syphilis". *The Lancet* 173 (1909): 1512-1515.
- FLEMING, Alexander. "On the etiology of *Acne vulgaris* and its treatment by vaccines" *The Lancet* 173 (1909): 1035-1038.
- FLEMING, Alexander. "Demonstration of simple method of serum diagnosis of syphilis by the 'Complement deviation' method". *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 2 (1909): 220-225. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 10 novembro de 2007.

- FLEMING, Alexander, "The present position and treatment of syphilis". *Proceedings of Royal Society Medicine* 3 (1910): 219-222. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 10 novembro de 2007.
- FLEMING, Alexander. "Discussion on vaccine therapy: its treatment, value, on limitations". *Proceedings of Royal Society Medicine* 3 (1910): 137-139. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 16 maio de 2007.
- FLEMING, Alexander & Colebrook, Leonard. "On the use of salvarsan in the treatment of syphilis", *The Lancet* 177 (1911): 1631-1634.
- FLEMING, Alexander. "Discussion on the salvarsan in ophthalmic practice". *Proceedings of Royal Society Medicine* 7 (1914): 103-104. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; acesso em 10 de novembro de 2007.
- FLEMING, Alexander. "The bacteriology of septic wounds". *The Lancet* 186(1915): 638-648.
- FLEMING, Alexander. "Lysozyme – A bacteriolytic Ferment Found Normally in Tissues and Secretions". *The Lancet* 204 (1929): 217-220.
- FLEMING, Alexander. "Discussion on the effect of antiseptics on wounds". *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 23 (março1940): 487-502. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 16 maio de 2007.
- FLEMING, Alexander. "Louis Pasteur", *British Medical Journal* 4 (1947):518-522. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 10 novembro de 2007.
- FORREST, Richard D. "Early history of wound treatment". *Journal of the Royal Society of Medicine* 75 (1982): 198-205. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; acesso em 26 de janeiro de 2008.
- FRIEDMAN, Meyer & Gerald W Friedland. *As dez maiores descobertas da medicina*. São Paulo: Companhia de Bolso, 2006.
- HALLER, John S. "Trench Foot – A study in military-medical responsiveness in the Great War, 1914-1918". *Medicine in Perspective* 152 (1990):729-733. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov).; Internet; acesso em 26 de janeiro de 2008.

- HARE, Ronald. "New light on the history of penicillin". *Medical History Journal* 26 (1982):1-24. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov); Internet; acesso em 26 de janeiro de 2008.
- HARE, Ronald. "The scientific activities of Alexander Fleming, other than discovery of Penicillin". *Medical History Journal* 27 (1983): 347-372. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 16 maio de 2007.
- HIRSCH, James G." Immunity to infectious diseases: review of some concepts of Metchnikoff". *Bacteriological Review* 23 (1959):48-60. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 29 maio de 2009.
- HOBBS, Eric. "*Era dos Extremos*", São Paulo: Companhia das Letras, 1998.
- KEVLES, Daniel J. "*Histórias esquecidas da Ciência*", A busca do impopular: uma história de coragem, vírus e câncer, Org. Robert B. Silvers. São Paulo: Ed. Paz e Terra, 1997.
- LANDSBERG H. "Prelude to the discovery of penicillin". *Isis* 40, nº 3 (1949):225-227. Disponível em <http://www.jstor.org>;Internet; acesso em 13 de outubro de 2006.
- LEADING articles, "Wassermann". *The British Medical Journal* 1 (1966):436-437. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 28 de agosto de 2008.
- LISTER, Joseph. "Antiseptic principle in the practice of surgery". *The British Medical Journal* 2 (1867): 246-248. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 19 de junho de 2008.
- LITERARY notes, "Ehrlich's new antisyphilitic remedy". *The British Medical Journal* 1(1910):793-794.
- LOWY, Ilana. "Immunology and literature in the early twentieth century: Arrowsmith and doctor's dilemma". *Medical History* 32 (1988): 314-332. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 04 de janeiro de 2008.
- MAUROIS, Andre, *The Life of Alexander Fleming*". New York: E.P.Dutton&Co, 1959. Disponível em <http://archive.org>. Internet; acesso em 28 de agosto de 2008.

- METCHNIKOFF, Élie. *Immunity in infective diseases*. London: Cambridge University Press, 1905. Disponível em <http://archive.org>; Internet; acesso em 04 de janeiro de 2008.
- MORGAN, W.Parry, “The treatment of wound infections”. *The British Medical Journal* 1 (1916):8-22. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 20 de abril de 2008.
- MORTON, Charles.A. “The treatment of wounds infections by antiseptics”. *The British Medical Journal* 2 (1915): 778-779. Disponível em [http:// www.pubmed.gov.](http://www.pubmed.gov); Internet; acesso em 03 de julho de 2008.
- PARKER, Franklin, “Wright, Almroth Edward”, In: Gillispie, Charlton Coulston (org), *Dictionary of Scientific*, vol.XIII:511-512, New York: Charles Scribner’s Sons, 1981.
- SCHUTZE, H. “Iodine and sodium hypochlorite as wound disinfectants”. *The British Medical Journal* 2 (1915): 921-922. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 20 de abril de 2008.
- SMITH, J.Lorrain , DRENNAN, A.Murray, BETTIE, Theodore, CAMPBELL, Willian. “Antiseptic action of hipochlorous acid and its application to wound treatment”. *The British Medical Journal* 2 (1915):129-133. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 20 de abril de 2008.
- WOODHEAD, G. Sims, “A discussion on phagocytosis and immunity”.*The British Medical Journal* 4 (1892):373-378. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov) ; Internet; acesso em 29 de maio de 2008.
- WRIGHT, Almroth E. “Therapeutic inoculations of bacterial vaccines”. *The British Medical Journal* 1 (1903): 1069-1074. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Internet; acesso em 03 de setembro de 2008.
- WRIGHT, Almroth E. “On the treatment of acne, furunculosis and sycosis by therapeutic inoculations of staphylococcus vaccine”. *The British Medical Journal* 1 (1904):1075-1077. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Internet; acesso em 05 de setembro de 2008.
- WRIGHT, Almroth E. “Vaccine therapy-its administration, value and limitations”. *Proceedings of Royal Society of Medicine* 3 (1910):1-38. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Internet; acesso em 15 de outubro de 2008.

- WRIGHT, Almroth E. "Discussion on immunity". *Medico-Chirurgical transactions* 84 (1915): 271-291. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov). Internet; acesso em 11 de junho de 2009.
- WRIGHT, Almroth E. "The Treatment of infected wounds by Physiological Methods (Drainage of Infected Tissues by Hypertonic Salt Solution, and Utilization of the Antibacterial Powers of the Blood Fluids and White Blood Corpuscles.)". *The British Medical Journal* 1 (1915): 793-798. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov).; Internet; acesso em 19 de junho de 2008.
- WRIGHT, Almroth E. "The treatment of infected wounds by physiological methods (Delivered (With demonstrations) at the opening of an exhibition of surgical application.)", *The British Medical Journal* 2 (1915): 01-72. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov).; Internet; acesso em 19 de junho de 2008.
- WRIGHT, Almroth E. "The treatment of infected wounds by physiological methods (Delivered at the opening of an exhibition of fractures apparatus.)", *Journal of the Royal Society of Medicine* 1 (1915): 717-721. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov).; Internet; acesso em 19 de junho de 2008.
- WRIGHT, Almroth E. "Wound infections and on some new methods for the study of the various factors which come into consideration in their treatment". *The British Medical Journal* 1 (1915): 762-764. Disponível em [http:// www.pubmed.gov](http://www.pubmed.gov).; Internet; acesso em 19 de junho de 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)