

(*) ESTUDOS EXPERIMENTAES PARA A DEMONSTRAÇÃO DE PROTEINAS ESPECIFICAS NA LEPROA

por
A. W. NAYLOR-FOOTE
e
ARGEMIRO RODRIGUES DE SOUZA

Trabalho do Asylo Colônia "Santo Ângelo"

I

O presente é uma nota previa de certos trabalhos experimentaes feitos por nós no Asylo Colônia Santo Angelo. Pretendemos reservar uma publicação completa sobre os methodos adeante descriptos, os quaes serão aperfeiçoados e satisfatoriamente estandardizados, bem como sobre as provas diagnosticas e prognosticas que serão applicadas em um numero de casos sufficientemente grande para permitir a sua avaliação.

II

Até o presente momento não ha uma demonstração definitiva e cabal da existencia de elementos immunologicos especificos em tecidos leprosos.

Gay (1) em 1939 disse: "Serological tests have proved of no conclusive service, either in diagnosis of the disease, or as a proof of

(*) Apresentado á Soc. Paulista de Leprologia em 11 de Janeiro de 1941.

the specific etiological nature of micro-organisms isolated from leprous tissues." e "...a positive diagnosis depends... on clinical observation ... and bacteriological demonstration of acid fast bacilli."

Offerecem grande interesse sob o ponto de vista prognostico as reacções produzidas pela inoculação intradérmica de tecidos contendo bacillos de Hansen triturados e esterilizados, particularmente os trabalhos realizados por Mitsuda (2) , Hayashi (3), Chyuto (4), e outros.

Mas, ainda o diagnostico e prognostico na lepra é dependente na maior parte da observação clinica.

III

As nossas experiencias foram a principio realizadas usando-se como antígeno o extracto mechanico-aquoso soluvel (lepromina ou leprolina) de Mitsuda. Este antígeno não correspondeu ás expectativas por varias razões, entre as quaes o ser muito difficil sensibilizar animaes de laboratorio contra a parte especifica deste antígeno o qual contem uma grande percentagem de protheinas presentes nos tecidos normaes, e variando enormemente o titulo antigenico. Assim sendo, foi impossivel standardizal-o e as propriedades heterologas invalidando completamente sua especificidade como gerador de anticorpos.

Varias experiencias foram feitas para o aperfeiçoamento de um methodo de preparação do antígeno homologo, eliminando as propriedades inespecificas do antígeno preparado por Mitsuda, protheinas estas já previstos por nosso collega Moacyr de Souza Lima (5).

Estas condições foram encontradas na maior parte pelo nosso antígeno "6-Beta" e "23-Delta", fracções preparadas de nodulos ou outros materiaes leprosos. O processo completo de extração destes antigenos não serão dado em detalhe porque o methodo está longe ainda de perfeição.

Para exemplo, em resumo, o methodo de preparação do antígeno mais simples, o "6-Beta" é o seguinte:

Os lepromas são retirados asepticamente por biopsia cortados em pequenos fragmentos, lavados e triturados. A quantidade de material é reduzida ao mínimo pelo aquecimento a 45°C com uma fraca solução de NAOH.

O resultado liquido é então centrifugado a 3.500 R.p.m. por uma hora e as materias residuaes lavadas tres vezes em sôro physiologico. Esta solução é neutralizada pela addição de acido chloridico e o sal removido por dialise. Para fixar a materia organica, a suspensão é aquecida a 60°C. por cinco horas com 1% de acido chaulmoogrico. As protheinas precipitadas são removidas por filtração e as gorduras, hydrolisadas pelo acido sulfurico a 1:200 que provavelmente se combina com o acido chaulmoogrico para formar um sulfo-derivado de acido gorduroso insaturado, serão removidas por dialise. O material é então lavado algumas vezes com acetona para effectuar a desintegração dos bacillos acido-resistentes. O material é dessecado sob pressão baixa e redissolvido.

O antígeno é então titulado e diluído para conter em 0,1 de cm de sôro physiologico a quantidade minima de antígeno que produza uma lesão necrotica no dia seguinte em um coelho normal de 1.200 gramas de peso injectado intradermicamente, seguida apôz 12 horas de intervalo por uma injeccção intravenosa de 1,0 cm³ de antígeno de Mitsuda (6). Esta diluição é igual a uma unidade de antígeno, o qual contem 10uu. por cm³.

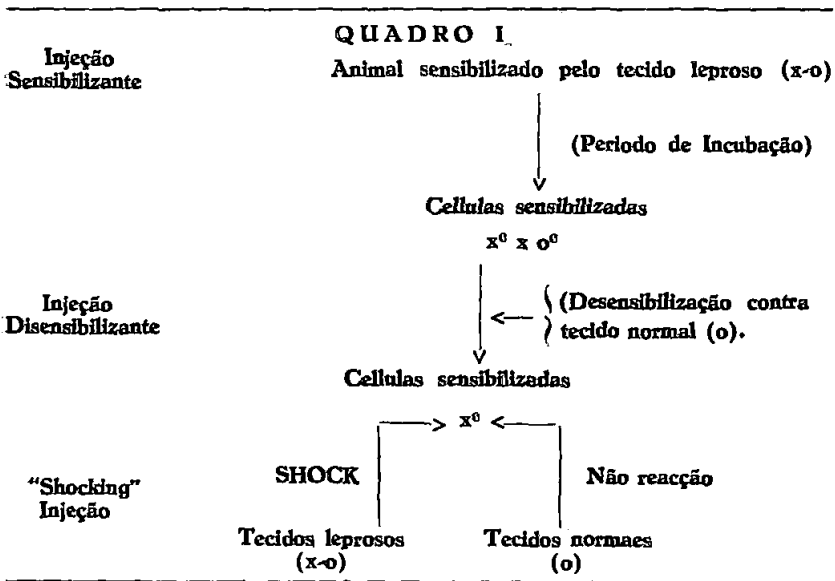
Muitas outras fracções antigenicas foram preparadas, algumas se mostrando mais activas do que a "6-Beta, porém esta tem sido por nós usada por causa de sua simplicidade e estabilidade, as demais offerecendo interesse só sob o ponto de vista imunologico e sobre as quaes trataremos mais tarde.

O presente methodo de preparação e standardização do antígeno é provisorio e está sujeito a modificação posterior.

IV

As primeiras demonstrações de proteinas especificas foram feitas do seguinte modo: Cobaias foram sensibilizadas contra o antígeno "6-Beta" e, decorrido um determinado espaço de tempo entre a injeccção de antígeno sensibilizante e o anaphylactogeno, que é a segunda injeccção, reproduzia-se a anaphylaxia. O shock anaphylactico foi reproduzido por varios antigenos (anaphylactngenos) depois da sensibilização pelo "6-Beta", por exemplo pelo muco-nasal leprotico, lympho, sangue, lepromina, urina, etc.

Nestes reacções tambem foram feitas neutralizações do phenomemo pela disensibilização especifica segundo o quadro I.



Em 1929, Shwartzman e Hanger notaram que, quando certos productos de bacterias são injectados sob a pelle de um coelho normal e decorridos 15 ou 20 horas sendo o mesmo producto injectado intravenosamente, occorre uma intensificação da reacção no local da injeccção original. O phenomemo não é produzido por antígeno não bacteriano por exemplo pelo sôro de cavallo ou albumina de ovo. Shwartzman notára a neutralização do phenomemo pelos sôros anti-typhicos quando o mesmo era produzido pelos bacillos de Eberth.

Temos verificado no laboratorio do Asilo Colonia Santo Angelo esta reacção nos coelhos usando preparações de tuberculos de lepra e outros materiaes leprosos que contem bacillos de Hansen, preparados pelo nosso methodo de extracção da fracção antigenica. Coelhos foram sensibilizados contra este antígeno e o phenomemo reproduzido pela segunda injeccção deste antígeno, porém nem sempre pelo antígeno de Mitsuda.

Com os antigenos "6-Beta" e "23-Delta" reproduzimos o phenomemo invariavelmente em todas tentativas usando-se para a segunda injeccção extracções de varios materiaes leproticos, sangue, urina, e tuberculos. Injeccções controles foram feitas com extractos de carne normal preparados pelo mesmo methodo.

Verificamos a neutralização da reacção pela titulação com sôro immune de leprosos. A reacção não foi neutralizada pela titulação com os sôros sanguíneos normaes usados para controle.

Usando este methodo experimentalmente para ao diagnostico sorologico da lepra com o nosso "6-Beta" fracção do antigeno, nós temos obtido os seguintes resultados:

Q U A D R O I I I

Tipo Cln.	Clinicam. Positivo	Clinicam. Negativo	Bact. Positivo	Bact. Negativo	TOTAL	Positivos	Negativos
cutaneo	30		28	2	30	30	
nervoso	17	1	8	10	18	18	
altas		3		3	3	2	1
contr. normaes		24		24	24		24

A technica da prova usada em nosso laboratorio é a seguinte:

Um coelho é injectado subcutaneamente com 0,3 cm³ do antigeno "6-Beta" que foi diluido com um excesso de 2:1 de sôro á estudar e aquecido em banho-maria a 30°C. por 45 minutos, misturando sempre. Injecções controles foram feitas tambem com o sôro mais o antigeno diluidos a 2:1 e a 1:2 respectivamente com sôro physiologico.

Depois de 12 horas uma unidade do antigeno é injectado na veia marginal da orelha.

Ao fim de 5 horas uma reacção positiva mostra uma intensificação ao lado da injectação sub-cutanea, uma area local de edema mais hemorragia caminhando para a necrose em um ou dois dias. As injectções controles não sofrem alterações sensiveis.

A reacção negativa mostra sómente uma pequena area avermelhada, como os controles, devida á irritação causada pelos anticorpos inespecificos, o que prova a existencia de lepra quando presente em quantidade bastante grande para dar uma reacção positiva.

Um coelho pode ser usado para uma serie de 12 tests, mas sómente para uma serie, porque os animaes serão rapidamente sensibilizados pelas proteinas extranhas e darão uma reacção positiva com as proteinas do sôro.

Os tests podem ser feitos tambem pela sensibilização dos animaes por repetidas injecções parenteraes, e injectando o antigeno e sôro como o anterior.

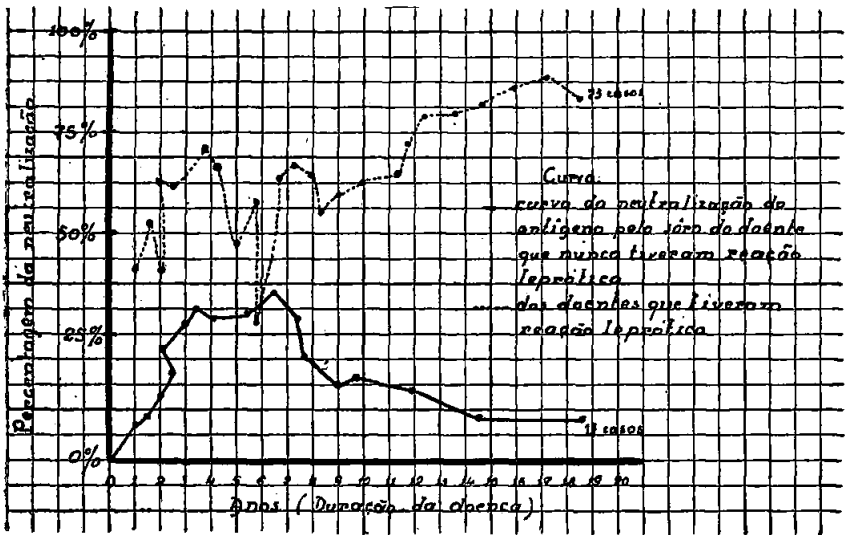
Nós temos usado uma serie de 5 injecções de 0,5 unidade do antigeno cada, intraperitonealmente sobre um periodo de quatro semanas.

O primeiro methodo é simples e auxilia no diagnostico; com o segundo methodo o mesmo coelho pode ser usado para 3 ou 4 series de tests.

V

Temos empregado o mesmo methodo para fins prognosticos, determinando a titulação do sôro por percentagens necessarias á neutralização de uma unidade do antigeno na diluição do 1:20 com os resultados mostrados em curvas de immuidade nas varias etapas da evolução da doença.

GRAPHICO I



VI

Os principais antigenos tem sido empregados em uma serie de testes para a fixação do complemento com resultados promissores, porém ainda é cedo para a publicação dos mesmos. Pretendemos tambem publicar mais tarde estudos sobre os efeitos dos va-

rios methodos therapeuticos na lepra, sob o ponto de vista immunologico, assim como um estudo mais completo dos nossos antigenos.

Os nossos agradecimentos aos Drs. Ferreira Gomes, Nelson Souza Campos Salles Gomes Jr. e medicos de Santo Angelo pelas facilidades que nós proporcionaram na confecção deste trabalho.

SUMMARIO E CONCLUSÕES

- 1) Um methodo foi descripto para a demonstração de elementos específicos nos tecidos leprosos.
- 2) Outro methodo foi descripto para a standardização de varios typos de antigenos.
- 3) Os antigenos usados foram neutralizados pelos sôros leprosos mas não pelos sôros normaes usados para controle.
- 4) A neutralização é presumidamente uma reacção antigeno-anticorpo e, portanto, prova da existencia do ultimo na lepra.
- 5) Varios antigenos foram preparados, mostrando-se nas provas mais activos que a leprolina de Mitsuda.
- 6) Um methodo foi applicado para o diagnostico e prognostico da lepra e usado com resultados promissores.
- 7) Estes processos podem ter applicação no estabelecimento da etiologia da doença, no estudo immunologico, e como um meio para avaliação dos processos therapeuticos.
- 8) Estas provas podem ser applicadas no diagnostico, prognostico e estudo de outras doenças, como por exemplo a tuberculose.

BIBLIOGRAPHIA

- 1) Gay, Fred. P. and assoc. "Agents of Disease and Host Resistance" Baillière, Tindall and Cox. London, 1935.
 - 2) Mitsuda, K. II Conf. Intern. Sulla Lebbra. Bellière. Paris, 1914.
 - 3) Hayashi, F. Intern. Jr. Leprosy. January 1933.
 - 4) Souza-Lima. Personal Communication. — Rev. Bras. Leprologica.
 - 5) Negro, E. 1932.
 - 6) Souza-Araujo. Act. Derm. Sif. 24:6 1932.
-

SUMMARY AND CONCLUSIONS

- 1) The authors describe a method of demonstration of specific immunological elements in leprosy tissues.
 - 2) A method is described for the standardization of "leprolin" or "lepromin" types of antigens.
 - 3) The antigens used were neutralized antigenically by leper serums but not by the serums of non-lepers.
 - 4) The neutralization is presumed to be an antigen-immune body reaction, and as such proof of the existence of type specific immune bodies in leprosy.
 - 5) Antigen fractions were prepared, several of which fractions gave stronger and more definite reactions than did the antigen of Mitsuda, et al.
 - 6) A method has been applied, based on a modification of the "protection tests" for the diagnosis of leprosy. The results of the first trials were promising.
 - 7) The test has been adapted to prognosis of the disease.
 - 8) The methods herein used have a possible application in the establishment of the etiology of the disease, the immunological study, and as a means of evaluating therapeutic methods.
 - 9) The methods described may be adapted to the diagnosis, prognosis, and study of other diseases, as for example tuberculosis.
 - 10) The present paper is merely a preliminary note and will be expanded in later publications.
-