

110

*As Carr Ami, Collega & Seniors Mem
teiro homenagem de
V. Brasil*

TRABALHO DO INSTITUTO DE BUTANTAN
DO PAPEL DOS LIPOIDES EM IMMUNOLOGIA

Função fixadora e capacidade modificadora dos
lipoides. -- Vaccinas lipoidicas

PELOS

Drs. Vital Brazil e J. Vellard

(Nota previa apresentada
á Academia Nacional de Medicina
em sessão de 15 de Julho de 1927)



EDITORA "POLUX"
AVENIDA SALVADOR DE SÁ, 166
RIO DE JANEIRO

TRABALHO DO INSTITUTO DE BUTANTAN DO PAPEL DOS LIPOIDES EM IMMUNOLOGIA

Função fixadora e capacidade modificadora dos lipoides.

— Vaccinas lipoidicas

Pelos Drs. VITAL BRAZIL e J. VELLARD

(Nota previa apresentada à Academia Nacional de Medicina
em sessão de 15 de Julho de 1927)

INTRODUÇÃO

Desde a descoberta da sorotherapia, um grande esforço tem sido feito em torno do problema da immumidade natural ou adquirida, tentando-se, por innumeradas pesquisas, precisar o mecanismo do phenomeno e fazer progredir os methodos immunologicos. A natureza proteica de todas as substancias capazes de desempenhar o papel de antígeno, a estreita relação dos anticorpos, com certas fracções do soro sanguineo, assim como o conjunto de propriedades physico-chimicas destes anti-corpos fizeram com que, durante muito tempo, se considerassem os phenomenos de immumidade exclusivamente dependentes das substancias proteicas. Alguns biologistas, entretanto, emittiram a opinião de que um outro grupo de substancias, aliás muito heterogenas, denominadas *lipoides* por Overton, em razão da solubilidade nos solventes ordinarios das gorduras, podia desempenhar um papel importante na defeza do organismo, chegando mesmo Ivar Bang a affirmar que a importancia biologica dos lipoides não cedia, em cousa alguma, á dos proteidos. Trabalhos recentes, tendo por objectivo o estudo da hemolyse e da reacção de fixação do complemento, de novo focalisaram a attenção sobre estas substancias.

Ha alguns annos passados, que, um de nós (Vital Brazil), procurando a razão do effeito benefico do soro normal em certos estados pathologicos, teve a ideia de experimentar separadamente as diferentes fracções, que entram em sua composição, tendo verificado, com o auxilio de varios clinicos, a acção benefica não só dos lipoides extrahidos do soro normal, como dos provenientes dos órgãos internos. Destas observações originaram-se os soros hormonicos, e hormo-gravidico e os extractos hormonisados, dotados todos de accentuada acção anti-toxica.

No intuito de estabelecer este facto em base experimental, precisando o papel dos lipoides, na defeza do organismo, emprehendemos longas e numerosas pesquisas, que trataremos de resumir, nesta nota preliminar, depois de havermos assignalado, em synthese, os trabalhos anteriores.

HISTORICO

As primeiras observações, sobre o valor biologico dos lipoides, são de Overton e de Meyer, confirmadas mais tarde por Nicloux, mostrando que os lipoides, particularmente abundantes na periphèria das cellulas de certos orgãos, principalmente dos centros nervosos, absorvem, em grande proporção, os anesthetics nos quaes se dissolvem. Esta afinidade especial dos lipoides explicaria a acção particular dos anesthetics sobre os centros nervosos, tendo sido applicada, sob a designação de theoria de Overton-Meyer, a diversas outras substancias toxicas.

A importancia biologica dos lipoides cresceu de valor com a experiencia classica de Wassermann e Takaki, consistindo na neutralisação, *in vitro*, da toxina tetanica por uma emulsão de substancia cerebral, facto este attribuido por Landsteiner, Loewe e Takaki e por quasi todos os autores que se seguiram, a excepção de Marie e Tiffenau e seus discipulos Laroche e Grigault, a fixação por lipoides cerebraes. A toxina diphterica, segundo differentes autores, entre outros, Laroche e Grigault, de Waele, Dold e Ungermann, seria, ao contrario, activada pelos lipoides, particularmente pelos do grupo dos phosphatides.

O estudo da hemolyse demonstrou o papel importante que os lipoides exercem sobre este phenomeno. Assim é que se baseando no facto do veneno de Cobra (*Naja tripudians*) só determinar a hemolyse em presença de traços de lecithina (formação de um complexo, Kobra-lecithide de Kyes e Sachs) diversos autores taes como Kyes, Sachs, Noguchi, Reicher foram levados a pensar que a lecithina e os phosphatides, em geral, desempenham um papel analogo na hemolyse provocada pelos soros.

Ultimamente Belfanti e seus collaboradores, retomando este assumpto da activação que os lipoides podem exercer sobre a hemolyse, attribuem a esse mecanismo, uma serie de phenomenos hemorrhagicos, observados em differentes estados pathologicos, taes como a purpura, a variola e a septicemia hemorrhagica, etc. A cholesterina e seus ethers desempenham um papel antagonista ao da lecithina, impedindo a acção hemolytica da saponina ou do veneno de *Naja*, em presença da lecithina, facto este que deu origem a diversos processos de dosagem da cholesterina (Peretz, Boidin, Handies). E' a presença de compostos cholesterinados na periferia das hematias (Pribam) que explica a resistencia daquelles globulos a hemolyse (Wright). Dahi provem a importancia, sempre crescente, dos lipoides na reacção de Wassermann e as outras reacções de fixação de complemento, reacções puramente lipotropicas, segundo a expressão de Noguchi, e o emprego, na totalidade das technicas actuaes de soro diagnostico da syphile, de um antígeno não especifico, da natureza lipoidica, extrahido de differentes orgãos, pelo alcool, ether ou acetona.

Além do papel de fixação, e de neutralisação, ou de activação, agem, alguns lipoides, sobre certos microorganismos,

principalmente sobre os protozoários e mais brandamente sobre as bacterias. Neufeld, Ficker, Vetrano, Mandelbaum assignalaram a acção lytica de diversos lipoides sobre os pneumococcus, gonococcus, certos estaphylococcus e o *B. typhico*; os proprios esporos carbunculosos poderiam ser destruidos, segundo a opinião de Segale. A afinidade da lecithina pela tuberculina e pelo *B. tuberculoso* foi estudada por Calmette, Massol, Guérin, Lemoine e Gérard.

Lemoine e Gérard, Laroche e Grigault fazem depender o grão de resistencia de um organismo, aos agentes infectuosos, da sua maior ou menor riqueza em lipoides ou mais exactamente em compostos cholesterinados. Nos arthriticos ha excesso de cholesterina e hypocholesterinemia nos tuberculosos, donde os resultados favoraveis obtidos, pelos dois primeiros autores, com o emprego dos lipoides biliars no tratamento da tuberculose pulmonar, resultados comparaveis aos recentemente obtidos por Freymuth. Chauffard, Laroche e Grigault procederam a dosagem da cholesterina do sangue no curso de diversos estados pathologicos, notando nas infecções agudas hypocholesterinemia inicial, seguida de augmento notavel desse lipoide, que póde attingir ao duplo da cifra normal no momento da defervescencia, quando o organismo domina a infecção. Estes primeiros trabalhos suscitaram numerosas observações posteriores, (Hartmann, Peretz, etc.) que confirmam de modo frisante o papel importante dos lipoides na defeza do organismo. A acção dos lipoides seria principalmente anti-toxica, donde seu augmento notavel nas toxemias, e sua abundancia particular no tecido lymphoide, nas amygdalas, na prostata e mesmo nos leucocytos (Wright). Entre os trabalhos recentes, citaremos em particular os de Cezar Piazza, que, com o fim de obter um corpo dotado de propriedades, a um tempo anti-toxicas e anti-septicas, preparou sob a denominação de phenolipoides, uma serie de productos, servindo-se de lipoides organicos de origens diversas (extractos ethereos ou alcoolicos de gema d'ovo, do cerebro, a lecithina, cholesterina) em combinação com phenoos (acido phenico, guaiacol, naphthol); estes corpos, verdadeiras combinações chimicas, indissociaveis em seus componentes de origem, reuniriam ás propriedades anti-toxicas dos lipoides, a forte acção esterilisante dos phenoos, não só *in vitro*, como *in vivo*. Sua acção anti-septica foi experimentalmente verificada, por F. Aliquo, na septicemia provocada pelo estaphylococco pyogeno dorado, por A. Carini com o micrococco de Bruce e por G. Antinori com o diplococco de Fraenkel. Na clinica, Piazza, V. Guercio e Bruno Kriss obtiveram resultados muito animadores nas infecções gripaes, com localizações pulmonares e A. Noto nas infecções puerperaes. Franco conseguiu, experimentalmente, effeito preventivo e curativo accentuados, contra a toxina tetanica; as suas conclusões, entretanto, foram contestadas por Plinio Bardelli, porque os pheno-lipoides seriam desstituidos de acção sobre a toxina tetanica *in vivo*. A despeito das criticas sugeridas pelos trabalhos de Piazza, forçoso é reconhecer-se que elles constituem uma contribuição muito importante

para o adeantamento dos nossos conhecimentos sobre a acção therapeutica dos lipoides.

Levando mais longe as investigações sobre este assumpto, alguns autores procuraram, ultimamente, as relações, que poderiam existir, entre os lipoides e os anti-corpos e si os lipoides teriam a função de antígeno, por si mesmo ou associados aos albuminoides. Os trabalhos de Kürt Meyer, de Dines e Schoenheit, de Thiele e Embleton, de Furth e Aronson mostraram a possibilidade de obter-se anti-corpos especificos em relação aos lipoides do *B. tuberculoso* e muito recentemente Negre e Boquet fizeram, com resultados animadores, a applicação destes lipoides no tratamento da tuberculose. O poder antigenico dos lipoides do *B. typhico* foi estudado por Zurukzoglu; o dos lipoides do *B. coli*, dos *estaphylococcus*, do *B. typhico* e do *paratypho A e B* por H. Stachenmeier. Sachs e seus collaboradores, Klopstock e Weil, em mui recentes e importantes contribuições, elucidam o papel antigenico dos lipoides, mostrando a possibilidade de obter-se, no coelho, por injecções de uma mistura de soro + lecithina ou cholesterina, um soro permitindo pesquisar por meio das reacções de fixação do complemento e de flocculação, até 1/100 do milligramma do lipode correspondente, reacção estrictamente especifica e mais sensivel do que os methodos de analyse chimica. Doer e Hallauer assignalaram o augmento do poder antigenico de diversos antigenos normaes, pelo contacto *in vitro* com os lipoides renaes (*erythrocytos*, soros heterologos, bacterias esporuladas) e a possibilidade de obter-se anti-corpos em relação a mistura de lipoides e outras substancias normalmente desprovidas de poder antigenico (auto-soro, peptona de Witte). Segundo Kizo Yamamoto a addição de cholesterina aos antigenos favoreceria a formação de anti-corpos.

Käte Frankenthal, procurando a relação dos lipoides, com os outros componentes do soro sanguineo, observou que no fraccionamento de soros de diversas origens, pelo sulfato de ammonio ou pela *electrodialyse*, os lipoides geralmente acompanham a fracção globulinica, não tendo encontrado senão uma excepção em um soro humano syphilitico.

Feito este ligeiro apanhado sobre as pesquisas de outros autores, que bem demonstra o crescente interesse, que o estudo dos lipoides tem despertado, no mundo scientifico, passaremos a tratar das nossas investigações sobre o papel dos lipoides nos phenomenos d'immuidade.

Estudo experimental dos lipoides

Definição e preparo. — Quando tentamos definir o termo *lipode*, nos encontramos em grande embaraço, não só pela falta de accordo, entre a opinião dos varios autores, que se tem occupado do assumpto, sobre o que se deve entender por lipode, como pela difficuldade ainda maior de encontrar uma formula verbal, que convenha a definição precisa de substancias tão varia-

veis e de propriedades tão diversas. Os chimicos, tendo á frente Abderalden, não consideram geralmente, como lipoides, senão as gorduras phosphoradas, os phosphatides, fendo por typo a lecitina. Mas ao lado destes phosphatides, muitas vezes com elles associadas, existe um grande numero de substancias, que se aproximam delles, pelos caracteres communs de solubilidade, acompanhando-os nos differentes processos de extracção. Umas são alcooles, como a cholesterina, outras são corpos mal definidos, como o protagon, outras são o resultado da combinação de lipoides e de assucares, taes como as cerebrosidas, ou de lipoides e proteidos, como as lecithalbuminas. Os methodos de analyse chimica, longos e delicados, não permitem senão estabelecer uma divisão geral destes corpos com individualisação de muy poucos dentre elles. Mesmo os que tem sido mais estudados e caracterisados, como a lecitina, offerecem variações tão grandes, que somos forçados a admittir variedades, conforme a origem, como no caso deste ultimo lipoide, varias lecithinas, com propriedades differentes. Assim, com Ivar Bang e a maior parte dos biologistas, tomamos o termo lipoide na accepção mais larga, considerando, como taes, todas as substancias extrahidas dos liquidos organicos e dos orgãos, soluveis no alcool e no ether sulfurico. Do ponto de vista pratico, para ter-se sempre o mesmo producto, o que é essencial, é empregar-se sempre a mesma materia prima, usando-se sempre o mesmo methodo de extracção. Assim, o mesmo orgão, com o mesmo processo de extracção, dá sempre o mesmo lipoide, emquanto que os lipoides variam sensivelmente de um para o outro orgão.

Os productos obtidos pelos methodos ordinarios, são extremamente complexos e impuros, exigindo para sua purificação o emprego de uma serie de dissoluções e evaporações, visando principalmente a eliminação de substancias extranhas ou inactivas.

I

Propriedades geraes dos lipoides

Os lipoides existem em maior ou menor abundancia em todos os tecidos do organismo. Nossas primeiras investigações se dirigiram naturalmente para os lipoides do meio sanguineo, ou mais precisamente do soro normal. Pelo tratamento do soro normal de boi, pelo alcool e pelo ether, extrahimos os lipoides nelle contidos, e, sem tratar de purifical-os, fizemos as seguintes experiencias preliminares e fundamentaes, que nos guiaram em ulteriores investigações. Experimentamos sobre a toxina diphterica e sobre o veneno de cascavel, *Crotalus terrificus*, dois toxicos facilmente dosaveis e dymnamisaveis, prestando-se, em consequencia, dessa circumstancia, admiravelmente aos ensaios que tinhamos em vista. Com a toxina diphterica deixamos, em contacto, por um prazo de 24 a 48 horas, in vitro, doses variaveis

de toxina e do lipóide em ensaio, injectando em seguida, as respectivas misturas em pombos. Verificamos, nestas circumstancias, que 100 milligrammas de lipóides neutralisavam nitidamente 100 minimas mortaes; que 200 milligrammas daquella substancia não impediam a acção local de 200 m. de toxina, impedindo entretanto, a morte do animal; que doses maiores da mistura lipóide toxina, guardada, embora, a mesma proporção não impediam a morte dos animaes em experiencia, matando-os, tanto mais rapidamente, quanto mais se acendia na escala das misturas. Com o veneno de cascavel fizemos experiencia analoga, deixando, em contacto, por tres horas, doses variaveis de veneno, com a dose fixa de lipóides, que não excedeu a 20 milligrammas, pelo facto das injectões serem feitas na veia do pombo. Verificamos, assim, que 20 milligrammas de lipóides neutralisam perfeitamente cinco millesimos de milligrammas, dose essa equivalente a cinco minimas mortaes.

Com estas experiencias iniciaes estabelecemos, pois, de modo certo, a capacidade dos lipóides fixarem, em certas circumstancias, tanto a toxina diphterica, como o veneno crotalico, não obedecendo esta fixação a uma proporção definida, verificando-se, ao contrario, um optimo de fixação, nas differentes misturas.

Depois deste primeiro ensaio, com os lipóides extrahidos do soro normal do boi, repetimos, com identicos resultados, as mesmas experiencias, com os lipóides extrahidos do soro normal de cavallo e do soro normal de porco, sendo que o deste ultimo animal revelou-se um pouco menos activo, em consequencia de impurezas constituídas, principalmente, por gorduras estranhas, nelle existentes, em mais forte proporção.

Aspecto dos lipóides do soro. — Os lipóides do soro, depois de refinados apresentam-se de consistencia pastosa, de côr pardo-amarellada. São muito soluveis no ether sulfurico, quasi insoluveis no alcool absoluto, insoluveis na agua com a qual formam suspensões muito finas; dão a reacção da cholesterina (Grigault-Liebermann) e da lecithina (molybdato d'ammonio); seu rendimento é fraco não excedendo a 3 grammas por litro.

Lipóides extrahidos dos órgãos e de outros productos organicos. — Estendemos nossas investigações aos lipóides hepaticos, cerebraes, biliares e do leite, extrahidos pelo nosso processo e a dois lipóides commerciaes, a ovo-lecithina de Merck e a cholesterina de Kalbaum e de Merck. Estas duas preparações foram utilizadas, sem tratamento algum; os outros lipóides foram purificados, segundo a mesma technica, tendo em vista a eliminção de gorduras inactivas.

Lipóides hepaticos. — Os lipóides hepaticos, refinados, de origem diversas (mammiferos e ophidios) apresentam-se com o mesmo aspecto e com as mesmas propriedades, approximando-se muito dos lipóides do soro, de que diferem apenas por sua coloração mais escura. Dão, com grande intensidade, a reacção da le-

cithina e contém cerca de 5 % de cholesterina. Seu rendimento é geralmente elevado, de 100 a 300 grammas por figado de boi.

Lipoides cerebraes. — Os lipoides cerebraes se apresentam sob o aspecto de uma pasta amarella secca; muito soluveis no ether, pouco soluveis no alcool, formam com a agua emulsões muito finas; contém 33 % de cholesterina e forte proporção de lecithina.

Lipoides biliares. — Os lipoides biliares, depois da refinação têm o aspecto de pasta viscosa amarellada, escurecendo com o tempo, de cheiro aromatico; muito soluveis no alcool e no ether, emulsionam-se com difficuldade na agua; muito ricos em cholesterina, de que contem 50 %, são quasi desprovidos de lecithina. Seu rendimento é muito fraco, variando de 400 a 500 miligrammas por litro de bile (de boi).

Tolerancia dos animaes de laboratorio aos lipoides. — Os lipoides refinados não possuem acção toxica e os animaes supportam, por injeccão subcutanea e intramuscular, doses de muitas grammas d'esta substancia, sem apresentarem o minimo accidente; quando não refinados determinam, por vezes, no ponto de inoculação nodosidades, que se caseificam em seguida, apresentando o mesmo aspecto ao das que foram assignaladas por Gaehlinger e Tilman. As injeccões endovenosas dos lipoides do soro, do figado e do cerebro, são igualmente bem toleradas, com a condição de serem feitas lentamente e sufficientemente diluidas; as injeccões endovenosas dos lipoides biliares determinam quasi sempre embolias mortaes.

Acção dos lipoides de origem hepatica. — A importancia funcional do figado, traduzindo-se pela repercussão das intoxicacões e das infecções n'esse orgão, repercusão acompanhada quasi sempre de phenomenos de degeneração gordurosa, observada de modo particular e constante nos animaes immunizados contra as peçonhas e contra as toxinas, nos conduziram a prestar uma particular attenção ao estudo dos lipoides hepaticos. As primeiras experiencias realizadas, com os lipoides d'esta origem, extrahidos pelo mesmo processo, que utilizamos para a obtenção dos lipoides do soro, sem a necessaria refinação, deram resultados mediocres, revelando-se muito menos activos do que os do soro. Com a eliminacão, porém, das gorduras extranhas, obtivemos um producto perfeitamente comparavel, senão identico ao do soro normal, tanto por seu aspecto physico-chimico, como por suas propriedades anti-toxicas. Esta identidade de acção confirmada por numerosas experiencias, nos autorisa a pensar que a quasi totalidade dos lipoides, que se encontram na circulação são de origem hepatica e que, ás multiplas e importantes funcções do figado, deve-se accrescentar mais uma, a *funcção lipoidica*, de grande alcance na defeza do organismo contra as intoxicacões e as infecções.

Acção dos lipoides hepaticos sobre as toxinas. — Estudando a acção dos lipoides de origem hepatica sobre diferentes toxinas

e venenos, fizemos variar as condições experimentaes, ensaiando a acção de contacto *in vitro*, a acção preventiva e a acção curativa. Cada toxina ou veneno se comporta de modo característico, mas os factos geraes são communs a todos elles.

Neutralisação in vitro. — Estas experiencias foram realisadas, deixando em contacto, durante certo tempo, quantidades variaveis de lipoides + toxina ou veneno, injectando-se em seguida essa mistura em animaes sensiveis. Os lipoides em contacto, com a toxina ou veneno, neutralisam sua acção toxica; esta neutralisação não é directamente proporcional ao peso de lipoides, nem ao tempo de contacto. Assim, um peso A de lipoides neutralisa, depois de uma hora, de contacto, uma dose C de toxina diphterica, mas a cabo de tres horas, neutraliza apenas 1,7 C de toxina e depois de seis horas 2,8 C. Fixando-se o tempo de contacto, verifica-se que A de lipoides neutralisa C de toxina, mas que tres A não neutralisam 3 C de toxina e sim 2 C; que 5 A de lipoides neutralisam apenas 2,6 C de toxina e que 12 A de lipoides apenas 5 C de toxina. Certas toxinas ou peçonhas são rapidamente neutralisadas em proporção relativamente elevada; outras necessitam um contacto mais prolongado; para todas, em condições experimentaes analogas, existe um peso optimo de lipoides para cada toxina abaixo do qual a neutralisação é muito menos accentuada, emquanto que quantidades muito mais fortes não determinam senão um pequeno augmento no gráo de neutralisação.

Acção preventiva e curativa. — Injectados separadamente algum tempo antes da toxina ou peçonha, têm os lipoides uma acção preventiva extremamente fraca e fugaz, difficil de evidenciar-se nos animaes de laboratorio. Traduz-se geralmente esta acção pela sobrevivencia dos animaes tratados sobre as testemunhas (toxina diphterica); com o veneno crotalico; facil de dymnamisar-se, consegue-se proteger o pombo contra a injectão posterior de duas ou tres minimas mortaes.

Esta acção protectora se enfraquece rapida e progressivamente á medida que se augmenta o intervallo entre a injectão endovenosa dos lipoides e a injectão intramuscular da peçonha, sendo mais accentuada com o intervallo de uma hora; com intervallo de tres horas o animal apresenta symptomas, mas se restabelece; com intervallo de seis horas apresenta apenas sobrevivencia sobre o testemunho.

A injectão de lipoides feita alguns minutos depois da do veneno crotalico, pode salvar o animal; com intervallo maior, porém, nenhuma influencia exerce sobre a marcha do envenenamento.

Parece, pois, que injectados separadamente lipoides, toxinas ou venenos, aquelles só actuam sobre estes, por um phenomeno de contacto e fixação e é porisso, que esta acção diminue e se extingue gradualmente com o desaparecimento dos lipoides da circulação.

Acção modificadora dos lipoides. — Quando se misturam, em certas condições, lipoides a toxinas ou a venenos, deixando-os em contacto, por um tempo longo, desde algumas semanas até alguns mezes, observa-se um phenomeno que se differencia do de simples fixação e que se traduz pela completa transformação das toxinas ou venenos em productos atoxicos com a conservação do valor immunisante. Esta acção modificadora dos lipoides não pôde ser confundida com a simples acção fixadora de que tratamos anteriormente, porque ella actua em circumstancias um tanto differentes e dentro de condições especiaes. Na simples fixação, os lipoides tem um ponto optimo de saturação pelas toxinas ou venenos, além do qual não se observa mais fixação, por mais que se prolongue o tempo de contacto. Pela acção modificadora, uma quantidade relativamente insignificante de lipoides, vae attenuando lenta e progressivamente a substancia toxica, até transformal-a completamente em toxoide. A acção modificadora só se exerce na ausencia da agua e em condições favoraveis de temperatura e se traduz finalmente pela formação de um producto de propriedades differentes dos elementos, que entram em sua composição. Assim é que os lipoides muito soluveis no ether, depois de combinados com as substancias toxicas, pela acção modificadora daquelles sobre estas, perdem por completo aquella propriedade.

Um outro facto, que nos leva a estabelecer a distincção, entre a acção fixadora e modificadora, é que certos lipoides de accentuada acção fixadora, não possuem, entretanto, propriedade alguma modificadora.

Acção sobre as bacterias. — Na literatura pouco numerosos são os trabalhos, que tratam deste assumpto, limitando-se pela maior parte ao registro da acção lytica dos lipoides sobre certos germes, como o gonococco, meningococco, o staphylococco e b. typhico. Ha, entretanto, um trabalho de Segale, publicado no *Patologica*, (volume II - 1910), que merece especial menção pelos resultados, a que chegou aquelle experimentador, que concluiu pela acção bactericida dos lipoides sobre a bacteridia carbunculosa. Pela leitura do artigo de Segale, não se pôde acceitar, sem restrições, as suas conclusões, quando affirma que os proprios esporos, tenham sido destruidos pela acção dos lipoides, pois baseia-se, principalmente, no facto de não ter conseguido culturas em gelose, depois do contacto da cultura com os lipoides e de não ter obtido a morte dos animaes inoculados, com a cultura assim tratada. Ora, tanto um, como outro facto pode ser observado, com a conservação da vitalidade dos esporos, conforme tivemos occasião de constatar.

No estudo da acção dos lipoides sobre o *B. anthracis*, verificamos que ella não destroe a vitalidade dos esporos; modifica simplesmente a virulencia das respectivas culturas, conservando o seu poder antigenico. Esta modificação da bacteridia carbunculosa é muito mais difficil de obter-se do que a das toxinas e venenos, dependendo das condições, em que devem ser tratadas as culturas e ao maior tempo de contacto.

Os resultados, que obtivemos com o *B. anthracis*, desapparecimento da virulencia, conservação das propriedades antigenicas e transmissão hereditaria d'estas propriedades, estabelecem grande analogia entre elles e os obtidos por Calmette e seus collaboradores com o bacillo tuberculoso, cultivado no meio biliado; é bem possivel que a attenuação da vaccina B. C. G. seja devida á acção lenta dos lipoides biliars. Infelizmente as experiencias que empreendemos no sentido de verificar esta hypothese, e de estudar a acção modificadora dos lipoides sobre outros germes, não nos autorisam, por enquanto, a tirar conclusões definitivas sobre este assumpto.

Acção de outros lipoides. — Além dos lipoides do figado e do sôro normal, estudamos, como ficou dito anteriormente, a acção dos lipoides cerebraes, a dos lipoides biliars. a dos lipoides do leite, a ovo-lecithina de Merck, a cholesterina de Merck e de Kahlbaum.

A acção fixadora dos lipoides cerebraes sobre a toxina tética é igual a dos lipoides hepaticos, mas é mui fraca ou quasi nulla sobre os venenos ophidicos. A acção modificadora d'estes lipoides tem se revelado igualmente nulla sobre as toxinas em que a temos ensaiado, não tendo conseguido com estes lipoides as vaccinas obtidas com os lipoides de origem hepatica.

Os lipoides biliars têm uma acção fixadora muito mais energica do que os lipoides de figado e de soro, tanto sobre as toxinas, como sobre os venenos. Verificamos actualmente sua acção modificadora.

Os lipoides do leite revelaram-se completamente inactivos.

A ovo-lecithina de Merck possui um poder fixador mais elevado do que os lipoides hepaticos, tanto sobre as toxinas, como sobre os venenos; a sua acção modificadora é extremamente fraca e sempre incompleta.

A cholesterina pura de Merck ou de Kahlbaum foi ensaiada apenas com relação a sua acção modificadora, aliás sem resultados apreciaveis. Quanto ao seu valor fixador não poude ser estudado, pela difficuldade de obter-se com esta substancia uma suspensão homogenea.

Valor dos lipoides em therapeutica e em immunologia. — A transformação das toxinas microbianas e dos venenos em substancias completamente atoxicas, bem como a attenuação da virulencia das bacterias, sob a influencia modificadora dos lipoides, com a conservação do valor immunisante tanto das substancias toxicas, como dos germes attenuados, estabelece em base segura a importancia dos lipoides tanto em therapeutica, como em immunologia.

Por esta acção modificadora dos lipoides conseguem-se vaccinas de alto valor immunisante, permittindo com uma, duas ou mais injectões proteger os animaes contra doses elevadas das toxinas ou venenos correspondentes e contra a infecção carbunculosa. As condições que presidem essa formação de vacci-

nas, assim como as propriedades destas são particulares a cada substancia antigenica. Algumas dellas se obtem com grande facilidade; outras exigem um tempo assaz longo para sua elaboração. Algumas pôdem, com uma só injecção, proteger contra fortes doses da substancia toxica correspondente, emquanto que outras exigem duas ou mais injecções para consecução do mesmo effeito. As differentes especies animaes não reagem de modo uniforme a acção das differentes vaccinas. Assim, o cão igualmente sensível aos venenos crotalico e bothropico, immunisa-se com muito mais facilidade com a vaccina crotalica, do que com a vaccina bothropica, ao passo que o contrario se observa com o coelho. Ha, sempre, uma relação directa entre a quantidade de vaccina recebida e a solidez e duração da immunidade adquirida. A immunidade necessita, para se estabelecer, de um prazo mais ou menos longo, segundo as especies de vaccina e de animaes, sobre os quaes se ensaia. De um modo geral, pôde-se, entretanto, estabelecer, como prazo medio, para aquisição de immunidade solida, duas a tres semanas depois da ultima applicação da vaccina. Nossas experiencias não nos autorizam, por emquanto, fixar a duração da immunidade, duração esta, que provavelmente será variavel com as vaccinas e com as especies animaes. Podemos entretanto, affirmar que animaes immunizados contra os venenos ophidicos e a toxina diphterica tem conservado o mesmo grão de immunidade, durante o periodo de seis mezes. Continuamos nossas verificações no intuito de fixar o limite de duração dessa immunidade. Quando a quantidade de vaccina é fraca, igualmente fraco é o grão de immunidade, que se attenua sensivelmente ao fim do segundo mez.

As vaccinas lipoidicas offerecem, ainda, um grande interesse para immunisação, rapida, e sem perigo, dos animaes productores de soros therapeuticos. Com o emprego das vaccinas ophidicas, é possível obter-se soros activos, em menos de dois mezes, emquanto que pelos methodos em uso, não se obtem soro em menos de quatro mezes. As propriedades immunisantes destas vaccinas são muito estaveis, não soffrendo alteração alguma, durante um anno de permanencia, sob a acção de luz e na temperatura do laboratorio. Os lipoides, extrahidos dos soros anti-toxicos, não são mais activos, do que os do soro normal; a riqueza lipoidica do soro dos animaes immunizados é cerca de $1/4$ a $1/2$ superior a do soro normal, mostrando ainda este facto o valor dos lipoides na defeza do organismo.

II

Vaccinas lipoidicas

Vaccina crotalica. — Como foi dito anteriormente, os lipoides de origem hepatica e os do soro normal fixam de modo sensível o veneno crotalico, por contacto *in vitro*; sua acção prolongando-se em condições especiaes e favoraveis, modifica progressivamente o veneno até transformal-o em um producto ato-

xico, dotado, entretanto, de valor immunisante muito elevado. Com uma só injeção da vaccina assim preparada, consegue-se proteger, seguramente, o coelho, contra a injeção de 1/2 gotta de veneno fresco de cascavel, dose essa capaz de matar sete coelhos, e de modo incompleto, contra uma gotta do mesmo veneno, restabelecendo-se geralmente os animaes, depois de haverem apresentado symptomas muito accusados. Todas as especies de animaes são facilmente immunisadas, com o emprego desta vaccina. Conseguimos vaccinar o cão, o carneiro, o cavallo, o burro, o coelho, e o cobaio. Depois de trez injeções, o soro de carneiro neutraliza 0,1 de milligramma de veneno crotalico por c. c., dose essa, igual a 100 minimas mortaes, resistindo o carneiro assim immunisado a injeção de 3 gottas de veneno fresco. Temos empregado, com exito completo, a vaccina crotalica para immunisar os animaes productores de soro anti-crotalico, quer usando exclusivamente a vaccina, quer usando primeiro a vaccina e depois o veneno puro. Com um e outro modo de proceder conseguimos soros activos dentro de 5 a 6 semanas. Por applicações repetidas da vaccina sobre a pelle escharificada, conseguimos conferir immuidade solida ao coelho e ao cão.

Vaccina bothropica, preparada com o veneno da *Lachesis lanceolatus*.—O veneno de *Lachesis lanceolatus*, como todos os venenos do mesmo genero, differere essencialmente do de *Crotalus terrificus*; determina a morte rapida dos pequenos animaes, mesmo com doses visinhas da minima mortal, por coagulação intravascular. Os animaes mais volumosos, a menos que se empregue a via venosa, succumbem com sobrevivencia de algumas horas, em uma segunda phase, por hemorragias generalizadas, provocadas pela incoaguabilidade do sangue, consecutiva á acção proteolytica intensa d'este veneno. A fixação d'este veneno, pelos lipoides, é menos accentuada do que a do veneno crotalico. As coagulinas, se fixando, com mais difficuldade, um prazo minimo de seis horas, é necessario, para neutralisar duas minimas mortaes, por via venosa, para o pombo; nas mesmas condições, uma minima mortal, por via intramuscular, não é completamente neutralizada, succumbindo o animal, com alguma sobrevivencia, sobre o testemunha. As doses, relativamente elevadas de veneno necessarias para determinar a morte, explicam a differença, e se, ao em vez, de considerar-se a minima mortal, tiver-se, em vista o peso bruto do veneno neutralizado, verifica-se que, sob este aspecto, o phenomeno com os dois venenos, crotalico e bothropico, tem uma intensidade de acção comparavel.

A transformação do veneno bothropico em vaccina é duas ou tres vezes mais rapida do que a do veneno crotalico. A acção immunisante d'esta vaccina é muito energica para o coelho e o cobaio; uma só injeção protege o coelho depois de muitas semanas contra uma gotta de veneno puro, e com duas injeções consegue-se proteger, contra duas gottas de veneno puro. Em todos os animaes, em experiencia, verifica-se que a acção necrosante local é muito attenuada, mas não completamente abolida.

O carneiro, o cavallo e o cão se immunisam, com certa difficuldade, exigindo maior numero de injeccões e um certo prazo, não inferior a um mez, para que se estabeleça, de modo seguro, a immunidade. Com o emprego da vaccina bothropica, conseguimos igualmente, dentro de algumas semanas preparar cavallos para o fornecimento do soro anti-bothropico sufficientemente activo.

Vaccina preparada com o veneno da Vipera Russellii (Daboia). — Dispondo de uma certa quantidade d'este veneno, julgamos de interesse verificar, sobre o mesino, a acção dos lipoides, porque representa elle typo differente do das nossas serpentes, podendo, os resultados obtidos, ser logicamente applicados a peçonha das outras viboras. Um contacto de seis horas é necessario para neutralisar duas minimas mortaes, por via venosa, no pombo; uma minima mortal, por via intramuscular, é neutralisada pelo contacto de uma hora. A transformação do veneno de Daboia em vaccina, se faz com a mesma facilidade do veneno bothropico. A immunidade conferida por essa vaccina é igualmente solida e facil de obter-se.

Vaccina preparada com o veneno de Naja tripudians. — O estudo do veneno Naja, do ponto de vista da acção dos lipoides, é particularmente interessante. Em primeiro lugar, por tratar-se de representante de grupo muito affastado dos que temos estudado até aqui, o grupo de COLUBRIDÆ proteroglyphas; depois, por terem sido assignaladas as propriedades activantes da lecithina, sobre a acção hemolytica d'esse veneno — formação de Kobra-lecithide de Sachs et Kyes — ao lado da acção contraria ou antagonista da cholesterina. Contendo os lipoides hepaticos, além de outros elementos, uma notavel próporção d'estas duas substancias, poderiam agir n'um ou n'outro sentido, sobre as propriedades hemolyticas d'este veneno, repercutindo esta acção sobre a toxicidade. Para termos uma ideia da acção provavelmente complexa dos lipoides hepaticos, sobre esse veneno, estudamol-os conjunctamente, com a acção da lecithina de Merck e com os lipoides biliares (em substituição a cholesterina difficil de manejar) riquissimos em cholesterina e sem lecithina, a julgar pela ausencia da reacção.

As primeiras experiencias do poder fixador, sobre este veneno, foram feitas no pombo. Tanto por via venosa, como por via intramuscular, os lipoides hepaticos, nas doses, que, habitualmente, neutralisam os outros venenos estudados, anteriormente, exerciam, ao contrario, notavel acção activante sobre o veneno de Naja, succumbindo os animaes, com doses inferiores a minima mortal. Esta acção activante revelou-se, quasi, tão energica, como a da ovo-lecithina de Merck. Os lipoides biliares, pelo contrario, neutralisaram, depois de uma hora de contacto, uma minima mortal por via venosa. Afim de verificar a acção de doses muito maiores de lipoides, retomamos estas experiencias, no coelho, tendo observado que, em doses muito elevadas, os lipoides hepaticos neutralisam a acção toxica do veneno de Naja, emquanto que,

em doses fracas, activam esta acção. Existe uma dose activante maxima, acima da qual esta acção se enfraquece progressivamente até predominar a acção neutralisante. Proseguimos ainda nas experiencias tendentes a obter neutralisação completa, para verificarmos em seguida as propriedades vaccinantes d'este veneno modificado.

Vaccinas arachnidicas.— Estudamos a acção dos lipoides hepaticos sobre os venenos de duas especies de aranhas o da *Lycosa raptoria*, de acção necrosante local e o da *Ctenus nigriverter*, de acção neurotoxica, assim como, sobre o veneno do escorpião, *Tytilus bahyensis*. Dada a difficuldade de obter-se grandes quantidades d'estes venenos, limitamo-nos a estudar a modificação dos mesmos, sobre a influencia dos lipoides e a respectiva transformação em vaccina. O veneno de *Lycosa raptoria*, ao contrario, do que se observa, com alguns venenos ophidicos necrosantes, é facil e rapidamente attenuado pela acção dos lipoides, não determinando mais o effeito local caracteristico sobre o derma. Os venenos de *Ctenus* e o de *Tytilus* são modificados um pouco mais lentamente. O poder antigenico destes tres venenos conserva-se integralmente, tendo-nos permittido, com o emprego das respectivas vaccinas, encurtar notavelmente a duração da immunisação dos animaes productores dos soros anti-arachnidicos. A vaccina lycosica, principalmente presta grandes serviços, permittindo injectar, em pouco tempo, fortes doses de venenos, sem o perigo de ulcerações, difficeis de evitar, quando se emprega o veneno puro e que retardam a immunisação.

Venenos do Bufo Marinus.— Ao contrario do que se dá, com todos os venenos, até aqui estudados, os lipoides nenhuma influencia exercem, sobre o veneno de sapo (*Bufo marinus*), cujas propriedades toxicas, nem são activadas, nem attenuadas, confirmando as profundas differenças já assignaladas entre esse veneno, e os de serpente e de arachnideos. As serpentes que recebem, por via gastrica, uma minima mortal d'este veneno de mistura e contacto prolongado, com forte dose de lipoides, succumbem ao mesmo tempo que as testemunhas, ou com insignificante sobrevivencia attribuiavel a absorpção mais lenta do veneno.

Vaccina diphtherica.— O poder fixador dos lipoides sobre a toxina diphtherica é elevado e cresce rapidamente com o tempo. Existe uma dose optima de lipoides capazes de fixar, em tempo dado, um certo numero de minimas mortaes d'esta toxina. Esta neutralisação é muito menos accusada, com quantidade mais fraca de lipoides, emquanto que com dose um pouco superior não se consegue augmento da acção fixadora. Facto porém, paradoxal é o que se observa, quando se exagera a proporção de lipoides em relação a toxina, pois, em taes circumstancias dá-se uma diminuição de poder fixador. Não observamos a activação da toxina diphtherica pelos lipoides, assignalada por alguns autores — Laroche e Grigault, de Waele, Dold e Ungermann. A acção preventiva dos lipoides contra esta toxina, por injectação subcutanea, no cobaio,

e endovenosa no pombo, é fraca não se traduzindo senão por maior ou menor sobrevivencia dos animaes. A transformação completa da toxina diphtherica em vaccina é demorada. Quando essa transformação é incompleta ou defeituosa, os animaes que recebem-na, não apresentam os symptomas habituaes, mas cachetisam-se e succumbem dentro de 15 a 30 dias depois da vaccinação; quando, ao contrario, a vaccina está bem preparada, é perfeitamente tolerada, bastando duas ou trez injecções, para proteger o cobaio, durante muitos mezes, contra doses muitas vezes mortaes de toxina.

Vaccina tetanica. — A acção dos lipoides, sobre a toxina tetanica, apresenta particular interesse em consequencia dos numerosos trabalhos succitados pela experiencia classica de Wassermann e Takaki, interpretada pela maioria dos autores, entre os quaes, convem notar Laudsteiner, Loewe, N. Takaki, por uma acção fixadora dos lipoides cerebraes sobre a toxina tetanica. Marie e Tiffenau, Laroche e Grigault pensam que os proteidos cerebraes desempenham o principal papel nesta reacção. Estes trabalhos nos levaram a estudar comparativamente a acção dos lipoides hepaticos e cerebraes sobre a toxina tetanica. Os lipoides hepaticos possuem, sobre a toxina tetanica, acção fixadora mais fraca, do que sobre a toxina diphtherica, não neutralisando, depois de contacto de muitas horas, senão uma ou duas minimas mortaes para o cobaio. Do mesmo modo que para a toxina diphtherica existe uma proporção optima de lipoide capaz de neutralisar, em tempo determinado, uma dose máxima de toxina. Proporções inferiores, ou superiores de lipoides mostram-se menos activas. Os lipoides do cerebro nos tem fornecido resultados sensivelmente identicos aos do figado.

Temos conseguido a transformação rapida da toxina tetanica em vaccina, faltando-nos ainda, a prova do poder antigenico d'esta vaccina.

Vaccina dysenterica. — A acção dos lipoides sobre a toxina dysenterica (Shiga) é muito mais lenta do que sobre as toxinas precedentemente estudadas. A acção fixadora é pouco accentuada; a modificação da toxina se faz, de modo seguro e completo, exigindo apenas um contacto assás prolongado, nunca inferior a quatro mezes. As propriedades immunisantes d'esta vaccina são muito energicas; uma só injecção protege o coelho contra doses muitas vezes mortaes de toxina, matando os animaes testemunhas em 24 horas. A immuidade se estabelece 15 dias depois da injecção da vaccina. Ha, como para todas as vaccinas, estreita relação entre a quantidade de vaccina injectada e a solidez e duração da immuidade adquirida.

Vaccina carbunculosa. — Os lipoides hepaticos não possuem poder algum bactericida sobre o *B. anthracis*. Depois de um contacto muito prolongado os germes conservam todas as propriedades culturæes, desenvolvendo-se, em abundancia, quando são semeados de novo. Si a vitalidade da bacteridia é conservada, sua virulencia, passa, pelo contrario, por modificação profunda, atte-

nuando-se progressivamente até desaparecer depois de um prazo mais ou menos longo. Animas extremamente sensiveis, como o cobaio, podem receber doses, consideraveis, sem apresentar signaes de infecção. Esta atenuação de virulencia, fixada pelos esporos, se reproduz nas culturas ulteriores.

A injeção duas ou tres vezes repetida, de *B. anthracis*, avirulentos pelo contacto prolongado dos lipoides, protege o cobaio e o coelho contra a inoculação de cultura muito virulenta.

A duração da immuidade e a quantidade de vaccina necessaria para proteger animas de porte maior não foram ainda determinadas; os resultados, porém, obtidos demonstram que os lipoides agem sobre a bacteridia carbunculosa, do mesmo modo que sobre as toxinas, permittindo obter, pelo mesmo methodo, uma vaccina bastante activa.

Com a vaccina, assim preparada, conseguimos immunisar, por escharificações, coelhos e cobaios.

Conclusões

Resumindo tudo quanto ficou dito anteriormente, baseados em abundante documentação, experimental, que será publicada opportunamente, podemos concluir :

- 1.º — Que tanto os lipoides do soro normal, como os extrahidos do figado, depois de purificados, têm as mesmas propriedades e agem do mesmo modo sobre as toxinas microbianas, as peçonhas e as bacterias, fixando e modificando as primeiras, atenuando a virulencia das ultimas.
- 2.º — Que a identidade de acção dos lipoides circulantes e dos de origem hepatica, assignala uma importante função do figado na defeza do organismo, contra as intoxicações e infecções, por meio da sua produção de lipoides.
- 3.º — Que na accão dos lipoides sobre as toxinas e peçonhas ha a distinguir duas phases: a da fixação, em que estas substancias são fixadas por aquelles e a da modificação em que os lipoides as transformam completamente em productos atoxicos, dotados de propriedades immunisantes.
- 4.º — Que essa acção modificadora dos lipoides permite estabelecer um methodo geral de preparo de vaccinas, de origem toxica, extremamente fecundo na pratica.
- 5.º — Que a acção dos lipoides sobre a bacteridia carbunculosa, modificando-lhe profundamente a virulencia, permite igualmente preparar uma vaccina contra esse germe e autorisa estender o mesmo methodo ao preparo de outras vaccinas microbianas.

