

PROVA DA HEMODISPERSÃO SEDIMENTAR¹

INALIO M. DE CASTRO * e NEWTON N. DE CASTRO **

Instituto de Leprologia, Rio de Janeiro, Guanabara

SUMÁRIO: Os autores analisam pormenorizadamente o sistema soro-hematia formolizada no qual se processa a aglutino-sedimentação (Fenômeno de Rubino).

Cada fase do referido sistema é investigada do ponto de vista físico-químico. Os dados obtidos são aproveitados pelos autores na elaboração de um sistema análogo, porém, com parâmetros próprios diferentes dos fixados por Rubino. Escolheu-se como evidência do fenômeno não a aglutino-sedimentação função do tempo, porém, o aspecto da massa globular sedimentada após 24 horas a $\pm 10^{\circ}C$ (Hemodispersão sedimentar).

A nova técnica proposta, aplicada sistematicamente, permitiu aos autores concluir

- a) não há "especificidade" correlacionada com enfermidades;
- b) o fenômeno resulta da atividade combinada de gamaglobulinas como dipolos, íons positivos do meio e polaridade propícia das hematias formolizadas;
- c) o aumento das gamaglobulinas séricas, sobretudo daquelas de ponto iso-elétrico do pH sanguíneo, determina o fenômeno, independentemente da causa mórbida que originou a hipergamaglobulinemia;
- d) sobretudo na lepra lepromatosa, o aumento das referidas gamaglobulinas é muito freqüente, e mantém-se muito tempo mesmo após regressão clínica da doença. É sugerida uma explicação para este último fato;
- e) os autores também referem uma atividade especial do formol sobre os soros reatores, propondo uma hipótese para a mesma.

É fato conhecido, desde o trabalho príncipe de **Rubino** (1926), que hematias formolizadas de carneiro são aglutinadas "in vitro" por, aproximadamente, 60% dos soros de lepromatosos; enquanto que as mesmas hematias não formolizadas, frente aos

mesmos soros, salvo raras exceções, não são aglutinadas. Este fenômeno, evidente na lepra lepromatosa (virchowiana), pouco freqüente nas outras formas da leprose, é excepcional quando pesquisado em soros de outras enfermidades. Como "Reação de Rubi-

¹ Recebido para publicação a 1 de Fevereiro de 1972.

* Do Instituto de Leprologia - Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) GB - Brasil.

** Do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da U.F.R.J. - GB - Brasil.

no" passou à semiótica da lepra, pois acreditava-se dependente a aglutinação de uma aglutinina específica. Não obstante ter sido essa prova afastada da semiotécnica leproológica, ela revela um estado imunológico muito frequente na forma grave da lepra.

Parece-nos inaceitável a afirmativa de "reação específica" no sentido de revelar, no soro de lepromatoso, uma aglutinina que seria atuante, sobretudo, sobre hemátias formolizadas, posto que os sistemas aglutinantes usuais prescindem desse tratamento o qual, de modo geral, atenua ou inativa a aglutinabilidade. Estranhamente, os trabalhos referentes à reação de Rubino omitem o papel do formol, embora seja este reagente muito ativo sobre diferentes grupos funcionais da molécula protéica.

Os conhecimentos por nós adquiridos em trabalho anterior (¹) deram-nos base à formulação de um outro sistema soro-hemátias formolizadas, com características peculiares que o distingue do sistema proposto por Rubino, e no qual se evidencia o fenômeno que denominamos "Hemodispersão sedimentar". Este consiste no seguinte: no estado inicial o sistema tem o aspecto duma suspensão globular homogênea; após sedimentação, notam-se aglomerados celulares dispersos no fundo do tubo, em oposição ao aglomerado único, compacto e centrado no eixo do tubo, que ocorre sob condições normais.

O quadro a seguir mostra as diferenças entre o nosso sistema e o proposto por Rubino.

QUADRO 1

Condições fixadas	Sistema de Rubino	Sistema dos autores (H.D.S.)
1 - Concentrações séricas	1:2 - 1:10	1:50 - 1:800
2 - Concentrações globulares	± 750.000 por mm ³	± 25.000 por mm ³
3 - Formolização das hemátias	método de Rubino 54 - 56 °C, 20 min.	método do autor não necessária
4 - Inativação dos soros		
5 - Temperatura de reação	37 °C	± 10 °C
6 - Tempo de reação	15 - 30 - 60 min.	24 horas
7 - Ação do formol nos soros	não investigada	investigada
8 - Aspecto da reação	aglutino-sedimentação	dispersão sedimentar
9 - Graduação dos resultados	variação de velocidade do fenômeno relacionada com as diluições do soro sob prova	aspectos do sedimento relacionados com as diluições do soro sob prova
10 - Influência hidrogeniônica	não referida	pH : 7,0 - 7,2 com tampão de fraca força iônica

MATERIAL E MÉTODOS

Sol. tampão de fosfatos N/15 para pH 7,0; sol. a 0,85% de NaCl (sol. ICS); sol. a 4,5% de sulfato de magnésio SO₄Mg, 7H₂O (sol. ISM); sol. a 2,7% v/v de formol comercial neutro p.a. na sol. ISM (sol. F); sol. a 40% v/v de formol na mistura tampão de fosfatos (sol. FT); sol. a 20% v/v da sol. de fosfatos na sol. de NaCl (sol. IT). As soluções devem ser mantidas no refrigerador, quando não em uso. A vidraria é a usual da técnica imunológica, apenas os tubos de hemólise devem ter 9 mm de diâmetro interno e fundo regular.

Formolização das hematias — Foi feita por nossa técnica já estudada, comparativamente a outras, por **Oliveira Lima & Seabra** (3). **Ei-la:** Colher cerca de 20 ml de sangue venoso de carneiro e desfibriná-lo, imediatamente, num frasco contendo pérolas de vidro. Filtrar o sangue já desfibrinado através de várias camadas de gaze. Misturar bem um volume (V) desse sangue com um volume 5V da sol. ISM de sulfato de magnésio, previamente resfriada a ± 10°C. Passar a mistura para tubo de centrifugação de fundo redondo e capacidade de ± 50 ml, anotando no exterior do tubo o nível alcançado pela coluna líquida. Centrifugar a 2.500 r.p.m., 10 min. Sifonar o sobrenadante desprezando-o. Acrescentar ao sedimento pequena porção da sol. ICS de NaCl e dispersar completamente a massa globular. Adicionar mais sol. ICS até atingir a marca antes feita no tubo. Repetir, por três vezes, a operação de lavagem. Após a última centrifugação, desprezar o sobrenadante e ressuspender a massa globular com sol. isotônica tamponada IT em quantidade

até atingir 2/3 da altura marcada no tubo. Filtrar em várias camadas de gaze previamente molhada com a sol. IT.

Correção da concentração globular para a prova H.D.S. — Encher um tubo hematócrito, graduado de 0-100 mm, com a suspensão filtrada e perfeitamente homogeneizada por vigorosa agitação. Centrifugar a 2.500 r.p.m., 10 minutos. Ler o resultado, em milímetros, do nível atingido pela coluna sedimentar. Corrigir a suspensão para uso na prova H.D.S. por meio da relação:

$$V_t = V_s \left(\frac{H}{3} - 1 \right)$$

na qual: V_t — vol. da sol. IT a ser acrescentada a um volume V_s

V_s — volume da suspensão, bem homogeneizada, obtida após o tratamento acima descrito

H — leitura do hematócrito em milímetros.

Observação: esta suspensão, de concentração globular padronizada, adicionada de 0,3% de formol comercial neutro p.a., conserva-se bem a 10°C durante 1 mês. Não obstante, tem ela tendência a dar falsas H.D.S. positivas. Por esse motivo, na prova H.D.S., não se pode prescindir do tubo-tesemunha. Aliás, é fácil reconhecer se a suspensão está inadequada, porque o disco formado pelo depósito sedimentar de glóbulos, não mais apresenta contorno regular no frasco que a contém.

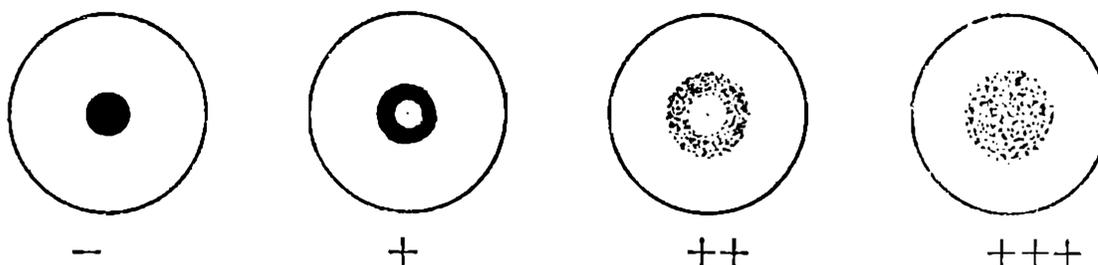
Execução da prova H.D.S. — Diluir os soros sob prova a 1:50 com a sol. isotônica tamponada IT. Dispor sete tubos de hemólise, num suporte adequado, e enchê-los de acordo com o esquema a seguir:

Tubos	1	2	3	4	5	6	T
Soro diluído 1:50	2,0	2,0	2,0	—	—	—	—
Solução tamponada IT	—	—	2,0 →	2,0 →	2,0 →	2,0 ↓	2,0
Sol. formólica FT	0,1	—	—	—	—	—	—
Susp. glob. (item 19)	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Diluições finais aprox.	1:50	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	negativo

OBSERVAÇÕES — a seta horizontal indica: misturar bem e passar 2,0 ml para o tubo seguinte, enquanto que a seta vertical significa: misturar bem e desprezar 2,0 ml. Notar que o tubo T contém apenas 2,0 ml da sol. IT e 0,1 ml da suspensão globular. O tubo 1 indicará se o soro positivo à H.D.S. é ativo mesmo com formol (F+), ou é inativado por ele (F-). Todos os conteúdos dos tubos devem ser bem homogeneizados. Levar o conjunto ao refrigerador a 10°C por 24 horas, mantendo este fechado para evitar trepidações prejudiciais ao processo de hemodispersão sedimentar.

RESULTADOS

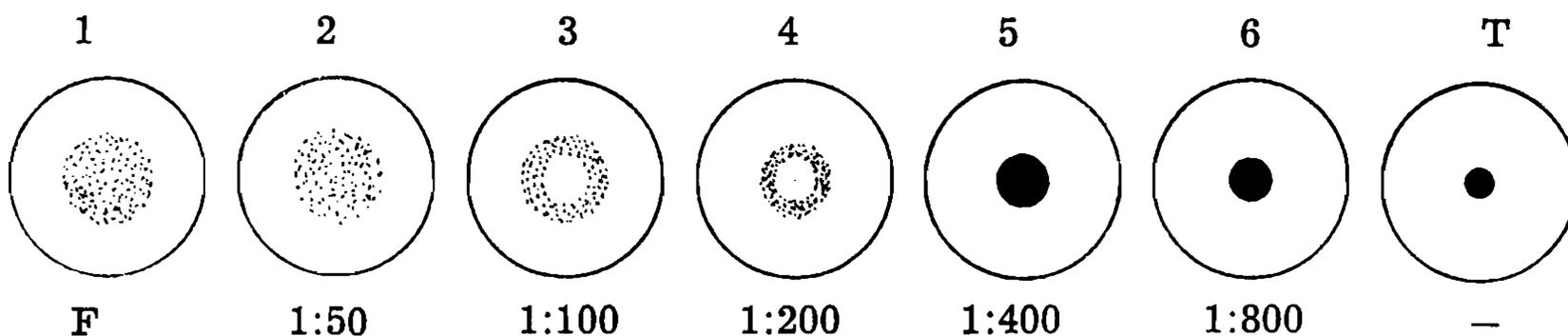
Leitura dos resultados — Aspectos dos sedimentos e classificação dos mesmos:



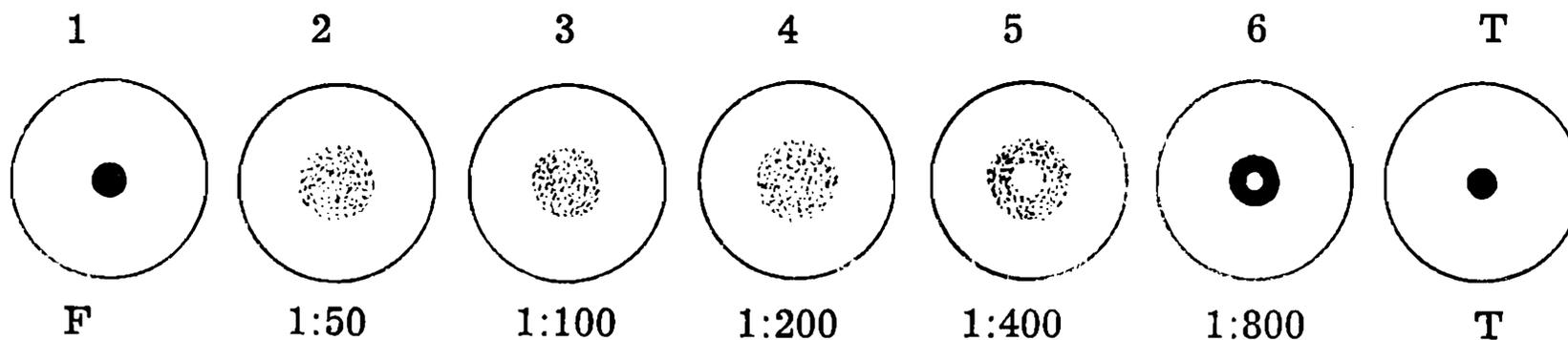
A maior diluição que ainda apresentar positividade de (+) é considerada como grau de positividade.

O tudo n.º 1, contendo formol, é assinalado no resultado com a letra F seguida do sinal que indica o grau de reação neste tubo.

Exemplos de resultados:



Reação positiva 1:200 F+++



Reação positiva 1:800 F-

As primeiras experiências feitas foram orientadas no sentido de verificarmos a influência da carga elétrica e da concentração iônica do meio sobre o fenômeno da hemodispersão sedimentar. Já em trabalho anterior (1), os detalhes e os resultados obtidos foram analisados, mostrando-se que os íons de carga elétrica maior do que +1 são ativos em função direta da carga e da concentração, executando-se o íon H⁺ particularmente ativo. Ainda mais, tínhamos demonstrado que a hematia formolizada comporta-se como partícula de

carga negativa. Continuando nosso plano experimental, constatamos mais o seguinte:

Influência da soro-albumina — Verificamos a participação da fração soro-albumina, acrescentando-se ao sistema quantidades crescentes de albumina bovina (Mann Research Laboratories, Inc. N. Y.). Não houve hemodispersão sedimentar mesmo nas concentrações de soro-albumina superiores às que poderiam ser encontradas em soros disproteinêmicos, conforme se vê no quadro n.º 2.

QUADRO 2

ATIVIDADE DA SEROALBUMINA BOVINA SOBRE A H.D.S.

Tubos	1	2	3	4	5	6	T
Seroalbumina *	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	—
Tampão	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	2,0
Glóbulos	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Resultado	—	—	—	—	—	—	—

* Sol. a 3% de soroalbumina bovina (Lab. Mann Inc. N. Y.)

A soroalbumina, no intervalo de concentrações 1,4 - 8,5 mg/ml, mostrou-se inativa frente à H.D.S.

Influência da gamaglobulina — Substituímos a soro-albumina pela gamaglobulina (Lab. ISA, Brasil). Esta fração, ao contrário da outra, mostrou notável atividade, visto que na con-

centração de 125 mg % já determina o fenômeno em foco. Esta propriedade não é inibida pela soro-albumina. Nos quadros n.ºs 3 e 4 são mostrados os resultados experimentais.

QUADRO 3

ATIVIDADE DA GAMAGLOBULINA HUMANA SOBRE A H.D.S.

Tubos	1	2	3	4	5	6	T
Gamaglobulina*	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	—
Tampão	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	1,4	2,0
Glóbulos	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Resultado	±	+	+	+	+	+	—

* Sol. a 1% de gamaglobulina humana (Lab. ISA).

Verifica-se que as concentrações de gamaglobulina igual ou maiores que 1,19 mg/ml provocam a H.D.S.

QUADRO 4

ATIVIDADE DA GAMAGLOBULINA, EM PRESENÇA DA SEROALBUMINA,
SOBRE A H.D.S.

Tubos	1	2	3	4	5	Talb.	Tglob.	Tsol. tamp.
Globulina*	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	—	1,0	—
Seroalbumina*	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	0,4	—	—
Tampão	0,9	0,8	0,6	0,4	0,2	1,6	1,0	2,0
Glóbulos	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Resultado	+	+	+	+	+	—	+	—

* Sol. idênticas às anteriores.

A seroalbumina não interferiu na atividade da gamaglobulina sobre a H.D.S.

QUADRO 5

COMPORTAMENTO DAS H.F. ADSORVIDAS COM SOROS H.D.S. POSITIVOS
E DAS H.F. NÃO-ADSORVIDAS, EM FUNÇÃO DO MEIO DE SUSPENSÃO

Meio de suspensão	(a) H.F. adsorvidas com soro H.D.S. positivo	(b) H.F. não-adsorvidas
1 Soro humano normal	H.D.S. positiva	H.S.D. negativa
2 Soro H.D.S. positivo	" "	" positiva
3 Soro H.D.S. positivo previamente tratado por H.F.	" "	" negativa
4 Sol. tampão pH 7,0	" "	" "
5 Água desionizada	" negativa	" "

Esta experiência demonstra os seguintes fatos:

- Os soros H.D.S. positivos são esgotados do fator essencial à hemodispersão sedimentar pelas hematias formolizadas que não foram usadas no esgotamento (3-b).
- Os soros H.D.S. negativos, os soros H.D.S. positivos previamente esgotados por H.F., e a sol. tampão de pH 7,0, quando servem de meio de suspensão das hematias formolizadas previamente adsorvi-

das com soro H.D.S. positivo, provocam a H.D.S. (1-a, 3-a, 4-a).

- Nos mesmos meios, as H.F. não-adsorvidas são incapazes de se dispersarem (1-b, 3-b, 4-b).
- Os eletrólitos são necessários ao processo da H.D.S. (5-a).

O que foi acima exposto sugere a seguinte explicação: as hematias formolizadas adsorvem algo dos soros H.D.S. positivos. Assim tratadas, reagem com eletrólitos do meio, provocando a H.D.S.

Influência adsortiva das hematias formolizadas sobre os soros H.D.S. positivos — Qualquer soro H.D.S. positivo, quer se trate de lepra, de mononucleose infecciosa, ou da doença do soro, torna-se H.D.S. negativo se pré-esgotado por hematias formolizadas. Por outro lado, as hematias adsorvidas com soro H.D.S. positivo adquirem certas propriedades que as tornam diferentes das hematias não-adsorvidas, quando postas a sedimentar sob determinadas condições, conforme demonstra a análise do quadro n.º 5. Não obstante o que ora descrevemos, as imagens eletro-

foréticas em gel de acrilamida, do soro H.D.S. positivo “in natura”, e do mesmo após esgotamento por hematias formolizadas, tornando-o indiferente às mesmas células, foram aparentemente muito semelhantes. Anteriormente (1), tínhamos assinalado o mesmo fenômeno, tanto por eletroforese em papel como através da imunoeletroforese.

Influência do formol — Preliminarmente, verificamos que o perfil eletroforético das soroproteínas modifica-se sob a ação do formol, máxime a par-

ESQUEMA DEMONSTRATIVO DA HEMODISPERSÃO SEDIMENTAR

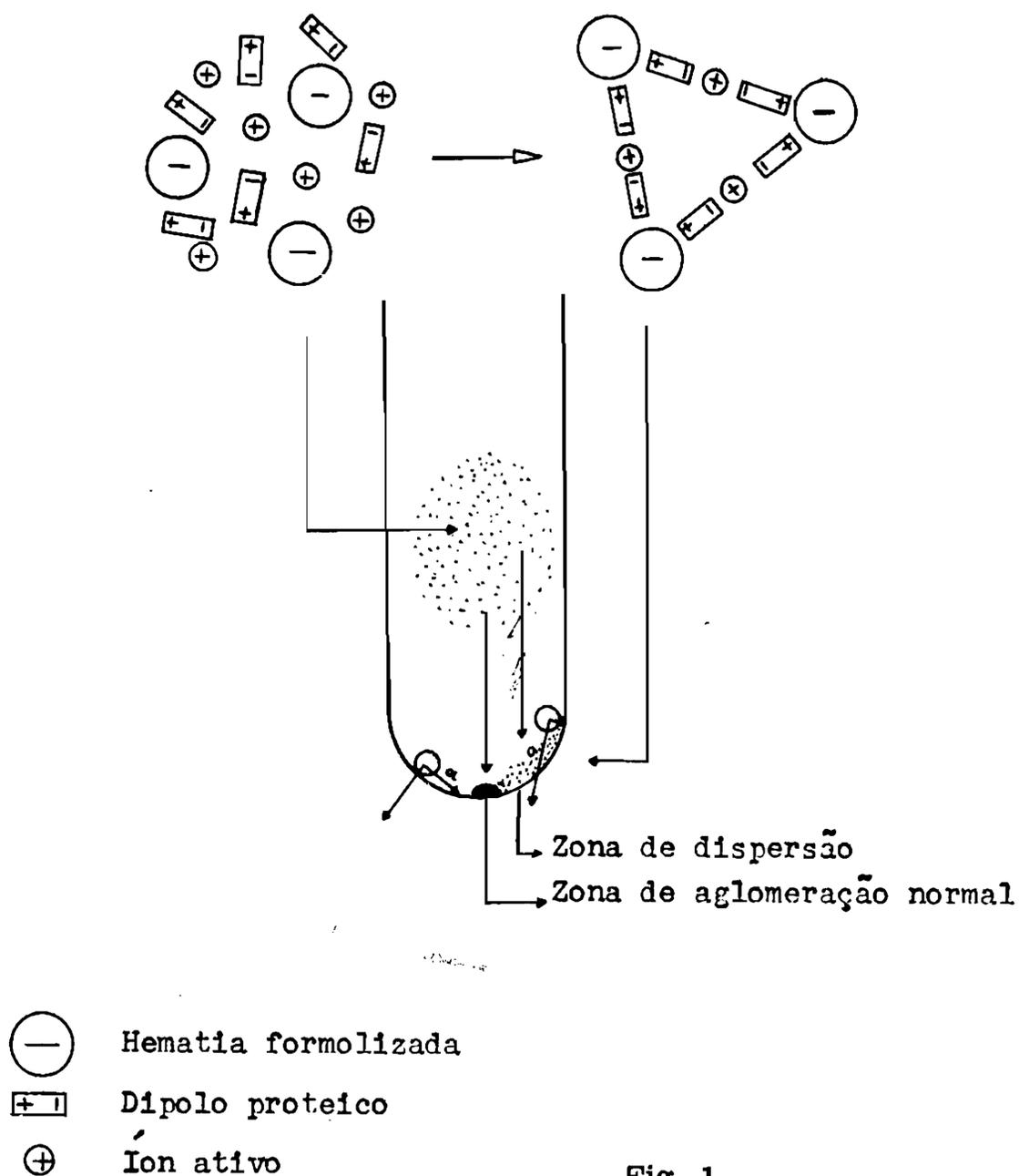
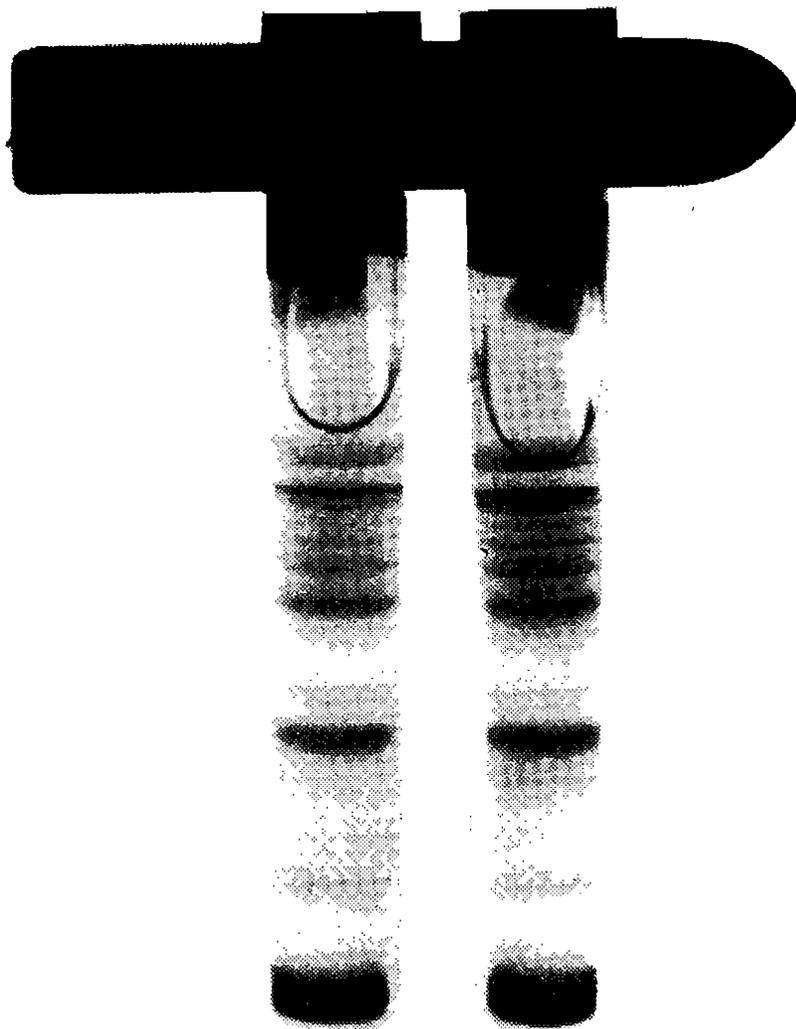


Fig. 1

IMAGENS ELETROFORÉTICAS DE SORO
H.D.S. POSITIVO ANTES (A) E APÓS
ADSORÇÃO COM HEMATIAS FORMOLI-
ZADAS (B)



A B

Fig. 2

te referente às globulinas, como pode ser visto no diagrama da fig. n.º 3. A seguir, constatamos que os soros H.D.S. positivos, bem como as gama-globulinas isoladamente, são completamente inativados quando pré-tratados pelo formol a 37 °C, durante 24 horas. Se o tratamento formólico é feito a 10 °C aproximadamente, e pelo mesmo tempo, encontramos duas modalidades de respostas: inibição da atividade dispersiva, ou nenhuma ação sobre ela. Esses dois modos de atuar do soro H.D.S. positivo, em pre-

sença do formol, mostraram-se regulares e constantes nas provas iterativas. Os fatos referidos são mostrados na fig. n.º 3 e nos quadros 6, 7 e 8.

Hemodispersão sedimentar e estados patológicos — Diante das experiências procedidas mostrando fatores que interferem no fenômeno, e com isto se estabelecendo uma padronização da prova, procuramos analisar o comportamento de alguns soros sanguíneos das enfermidades, abaixo relacionadas, que deram reação positiva à prova de H.D.S.

Lepra lepromatosa (virchowiana),
ver quadro n.º 8.

Lepra tuberculóide.

Mononucleose infecciosa.

Doença do soro.

Febre reumática.

De modo geral, não encontramos aumento significativo da fração g-maglobulina, por eletroforese em papel, nos soros examinados, à exceção dos casos lepromatosos que, freqüentemente, a tem aumentada.

QUADRO 6

ATIVIDADE DO FORMOL SOBRE SOROS SANGÜÍNEOS H.D.S. POSITIVOS

Casos	Soros "in natura" *		Soros formolizados previamente **
	c/formol	s/formol	
1	+	+	—
2	+	+	—
3	+	+	—
4	+	+	—
5	—	+	—
6	+	+	—
7	+	+	—

* Prova H.D.S. a 10°C.

** Soros adicionados de formol e mantidos na estufa a 37°C durante 24 horas antes da prova H.D.S. padronizada.

Dois fatos foram observados:

- muitos soros conservam a positividade mesmo com adição de formol ao sistema. Alguns, entretanto, são inativados pelo formol (tubo 5 e outros vistos no quadro (9) a 10°C;
- todos os soros H.D.S. positivos são inativados quando tratados pelo formol a 37°C durante 24 horas.

Complementarmente, verificou-se que o tratamento dos soros formol-resistentes a 10°C, durante 24, 48, 72 e 96 horas, não alterava a atividade desses soros frente às hematias formolizadas. Ambas as propriedades, formol-resistência e formol-inatividade a 10°C, repetiram-se em provas iterativas.

QUADRO 7

AÇÃO DO FORMOL SOBRE SOROS H.D.S. POSITIVOS, EM FUNÇÃO DA TEMPERATURA OPERACIONAL E DO TEMPO

Soros H.D.S. positivos	Temp. de 10°C			Temp. de 37°C 24 h
	24 h	48 h	72 h	
1	+	+	+	—
2	+	+	+	—
3	+	+	+	—

A formol-resistência de alguns soros, a 10°C, mantém-se mesmo que se prolon-

gue o contato do soro com o formol. A 37°C não se observa este fato.

ALTERAÇÃO DOS PERFIS ELETROFORÉTICOS DE SORO SANGUÍNEO
FORMOLIZADO

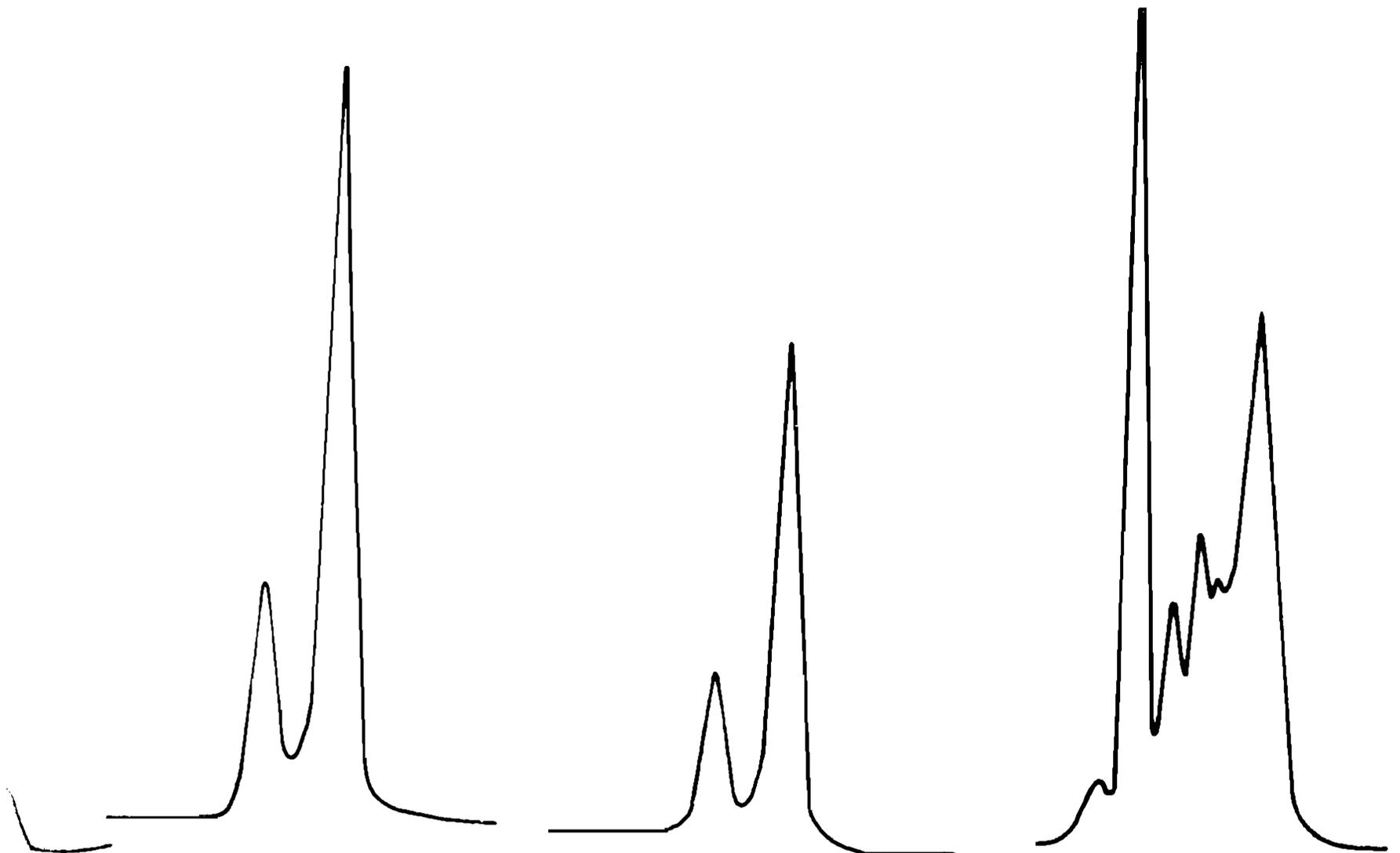


Fig. 3

Soro H.D.S. positivo pré-tratado pelo formol a 10°C durante 24 horas.

Soro H.D.S. positivo pré-tratado pelo formol a 37°C durante 24 horas.

Soro H.D.S. positivo «in natura».

Observação — Os diagramas são de um mesmo soro.

Discussão

A aglutino-sedimentação de Rubino, realizada num sistema constituído de hemátias formolizadas de carneiro e de soro humano, é considerada prova experimental de que nos soros de doentes de lepra, sobretudo da forma lepromatosa, e em muito alta percentagem quando comparada aos percentuais das outras formas dessa enfermidade, existe uma aglutinina específica. Analisamos devidamente esta interpretação, não encontrando

base para confirmá-la. Pelo contrário, acreditamos que a formolização das hemátias induziria nelas um estado de reatividade propício a que as imunoglobulinas, em geral, reagissem com elas, aglutinando-as, sem que isto fosse uma legítima reação antígeno-anticorpo.

O conjunto de dados, explanados a seguir, permite-nos uma explicação coerente do fenómeno de Rubino e da Hemodispersão sedimentar. As hemátias formolizadas, melhor que as na-

turais, têm carga elétrica líquida de sinal negativo.

Os íons H^+ , e outros de valência maior que +1, reproduzem, mesmo sem a presença de globulinas, o fenômeno de Rubino e a H.D.S.

A pequena sensibilidade da R. de Rubino, tão alegada, foi corrigida pela maior da prova H.D.S.

As gamaglobulinas, vistas em bloco, são as únicas soroproteínas, que produzem ambos os fenômenos.

Justamente as gamaglobulinas, e entre elas as imunoglobulinas, têm seu ponto isoelétrico correspondente ao pH do soro sanguíneo, ou muito próximo a ele. Assim, naturalmente elas estão num estado em que algumas propriedades — mínima solubilidade, máximo momento dipolar, e outras — são funções desse ponto singular.

Se associarmos estas propriedades com aquelas das hemátias formolizadas, e lembrando que estas quando em suspensão, individualmente, são contornadas por uma interfase que favorece os fenômenos adsortivos, encontramos coerência nas nossas objeções e afirmações. Ainda mais, podemos explicar o fenômeno da Hemodispersão sedimentar, com fundamento físico-químico, do seguinte modo: as células polarizadas negativamente, no estado inicial, estão bastante afastadas umas das outras para serem influenciadas e aglutinadas por campos elétricos de sinal contrário, porventura existentes entre elas. Sob a ação do peso, as células sedimentariam em disposição randômica, se fosse plano o fundo do tubo de ensaio. Contudo, nos tubos comuns há, no fundo, uma superfície curva que permite às células conta-

tarem com ela, em níveis diferentes, ao sedimentarem. Evidentemente, a própria natureza da curvatura favorece a que se estabeleçam diferentes componentes da aceleração gravitacional que dirigem as partículas para o nível de repouso no entorno do eixo do tubo. Desse modo, as células que entraram em contato com a superfície do fundo do tubo, de maior componente acelerador, podem juntar-se a outras em nível inferior próximo. Se nenhum campo elétrico, suficientemente forte, atuar nesse instante, todas as células continuariam a cair isoladas, por terem cargas elétricas de mesmo sinal, aglomerando-se finalmente, de modo homogêneo, em pequena área circular centrada no eixo do tubo. Opostamente, se o meio contém partículas com carga elétrica positiva, seus campos elétricos, se bastante intensos, prendem as células umas às outras, no momento que elas se juntam em diferentes níveis da superfície curva. O atrito dos aglomerados celulares é forte e bastante para retê-los no local. Daí, o aspecto de dispersão. O sistema H.D.S. foi constituído de tal modo que sua composição iônica, na ausência de globulinas, não produz o fenômeno da hemodispersão sedimentar. Entretanto, este se observa quando o teor de gamaglobulinas, possivelmente as de maior momento dipolar, ultrapassa valores acima da normalidade. Na fig. n.º 1, esquematicamente, explicamos a ação conjunta dos fatores que determinam o fenômeno sob estudo.

Conclusões: Mostramos que a H.D.S. ocorre em estados patológicos nos quais há maior probabilidade de aumento das imunoglobulinas no soro sanguíneo. Na lepra lepromatosa, em particular, as intensidades da H.D.S.

QUADRO 8
HEMODISPERSÃO SEDIMENTAR E PERCENTUAIS ELETROFORÉTICOS DAS
SOROPROTEÍNAS EM ALGUNS CASOS CLÍNICOS

Casos clínicos	Hemodispersão sedimentar						Percentual eletroforético				
	1:50F	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	Alb.	Alfa ₁	Alfa ₂	Beta	Gama
1 - Lepra lepromatosa	+++	+++	+++	+	-	-	38,7	6,9	10,8	11,3	32,4
2 - Lepra lepromatosa	+++	+++	+++	+++	+	-	43,0	5,6	13,4	8,9	29,0
3 - Lepra lepromatosa	++	++	++	+	-	-	50,3	5,8	9,9	10,5	23,4
4 - Mononucleose inf.	-	+	+	-	-	-	61,2	2,0	7,7	10,7	18,4
Normalidade							54,7	4,1	11,5	13,8	17,4
Varição (E. padrão)							± 2,8	0,3	0,1	0,9	0,8

foram as mais altas por nós encontradas, e mantinham certa relação direta com o teor de gamaglobulinas dos soros examinados (ver o quadro 9). Quando executamos a prova H.D.S. com gamaglobulina humana, notamos que a concentração desta, para dar a hemodispersão era, aproximadamente, três vezes maior do que as maiores

concentrações de gamaglobulinas dos soros testados. Isto nos sugeriu que apenas uma fração das gamaglobulinas, talvez somente aquelas sintetizadas por estímulo antigênico — as imunoglobulinas — fosse a responsável pelos fenômenos de Rubino e H.D.S.

QUADRO 9

HEMODISPERSÃO SEDIMENTAR NO SORO E NO PLASMA DE CASOS LEPROMATOSOS

HEMOSEDIMENTAÇÃO DOS MESMOS CASOS CLÍNICOS

Casos clínicos	Hemodispersão sedimentar						Hemosedimentação 1. ^a hora (Wintrobe)
	1:50F	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	
1-Soro	—	+	—	—	—	—	18 milímetros
Plasma	—	++	+	—	—	—	
2-Soro	++	+++	+++	++	+	—	15 "
Plasma	++	+++	+++	++	+	—	
3-Soro	—	++	+	—	—	—	4 "
Plasma	—	++	+	—	—	—	
4-Soro	—	+	—	—	—	—	1 "
Plasma	—	++	+	—	—	—	
5-Soro	+	+++	+++	+++	++	—	16 "
Plasma	+	+++	+++	+++	++	+	
6-Soro	++	+	—	—	—	—	1 "
Plasma	++	+	—	—	—	—	
7-Soro	++	++	+	—	—	—	21 "
Plasma	++	+++	++	+	—	—	
8-Soro	—	+++	+	—	—	—	6 "
Plasma	—	+++	++	+	—	—	
9-Soro	—	—	—	—	—	—	35 "
Plasma	—	+	—	—	—	—	
10-Soro	—	+++	++	—	—	—	32 "
Plasma	—	+++	++	+	—	—	
11-Soro	—	—	—	—	—	—	2 "
Plasma	—	—	—	—	—	—	
12-Soro	++	++	+	—	—	—	4 "
Plasma	++	+++	++	+	—	—	
13-Soro	+	+++	++	+	—	—	8 "
Plasma	+	+++	++	+	—	—	
14-Soro	—	+++	+++	++	—	—	46 "
Plasma	—	+++	+++	++	+	—	
15-Soro	+	+++	++	+	—	—	42 "
Plasma	+	+++	+++	++	+	—	
16-Soro	—	+++	+++	+++	++	+	54 "
Plasma	—	+++	+++	+++	+++	+	

Apenas como hipótese inicial para futuras investigações, exporemos nossas idéias a respeito dum fenômeno associado à H.D.S. que denominamos "formol-inativação à baixa temperatura", nitidamente percebido através do quadro n.º 8. Percebemô-lo ao praticar a prova H.D.S. num soro de doente lepromatoso há muitos anos com regressão clínica da enfermidade, e sem nunca ser presa da reação leprotica. Ainda mais, a intensidade da H.D.S. foi a maior que até agora registramos, sendo que a "formol-inativação" manteve-se constante em todas as provas subseqüentes. Este fato levou-nos a pensar que as imunoglobulinas, quando recentemente sintetizadas pelas células imunocompetentes, apresentam certa disposição espacial que não permite ao formol agir sobre grupos formol-seletivos da macromolécula protéica. Se o catabolismo dessas imunoglobulinas circulantes fosse retardado por insuficiência do SRE, elas permaneceriam mais tempo em circulação, sofrendo algo de desnaturação que favoreceria, conseqüentemente, a exposição dos referidos grupos reatores. Lembremos que as macromoléculas protéicas, no seu ponto I.E., tendem a grupar-se em aglomerados de dimensão micelar, ou ainda maior, e que as gamaglobulinas, peculiarmente, por terem seu ponto I.E. coincidente com o pH sanguíneo, têm maior possibilidade do que as outras soroproteínas de aglomeração macromolecular nesse pH. Por outro lado, o SRE exerce, entre outras, a função de "limpar" a corrente sanguínea de partículas estranhas ao meio circulante. No caso específico da lepra, doença na qual o impacto bacteriano leva à necrobiose incalculável número de células histiocitá-

rias do SRE, é de se esperar, máxime na lepra lepromatosa difusa, talvez uma hiperfunção péxica dessas células, porém, certamente uma hipofunção tardia dada à necrobiose. Se temos como certo que nesses casos o sistema linfo-plasmático, onde há síntese de imunoglobulinas, continua a funcionar, talvez hiperativamente como pensa Almeida (2), a realização conjunta de ambos esses fatores seria apoio à nossa interpretação de que, no lepro-lepromatoso, haveria produção de imunoglobulinas, de modo normal, ou mesmo exacerbado, induzida por variados antígenos, e um bloqueio parcial do SRE que vaforeceria a permanência, por mais tempo na corrente sanguínea, dessas globulinas pelo atraso do seu catabolismo nesse sistema.

SUMMARY

The authors investigated in detail the serum-formolized erythrocyte system in which the agglutino-sedimentation (Rubino phenomenon) takes place.

Each phase of this system is investigated from the physico-chemical view point. The authors took advantage of the data obtained for the elaboration of an analogous system with its proper parameters, different from those established by Rubino. As evidence of the phenomenon the aspect of the globules mass sedimented after 24 hours at $\pm 10^\circ\text{C}$ (Sedimentary Hemodispersion) was chosen instead of the agglutino-sedimentation rate.

The new proposed technic, systematically applied allowed the authors to draw the following conclusions:

- a) there is no "specificity" correlated to diseases;
- b) the phenomenon in question results from the combined activity of gammaglobulines as dipoles, positive ions in the medium and propitious polarity of the formolized erythrocytes;
- c) the raise of seric gammaglobulines, especially those with isoelectrical point at same level as blood pH, is responsible for the phenomenon, independently of the morbid cause that originated the hypergammaglobulinemia;
- d) mainly in lepromatous leprosy, the increase of the mentioned gammaglobulines is very frequent and lasts a long time even after clinical regression

of the disease. An explanation for such fact is suggested;

- e) the authors have reported also an special activity of the formaldehyde upon the reacting sera and build up a hypothesis for this fact.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — CASTRO, I.; ALMEIDA, S.; CASTRO, N. 1963. Prova de miocontração sensível aos soros de leprosos — *VIII Cong. Int. Lep.* 3: 332-346.
- 2 — ALMEIDA, J. O. 1963. The meaning of antibody titer in leprosy, determined by complement fixation with antigens prepared from tubercle bacilli — *VIII Cong. Int. Lep.* 3: 263-273.
- 3 — LIMA, A. O.; SEABRA, O. 1963. Aglutinação com hemátias formolizadas e taninizadas — *Arq. Bras. Med.* 53, (1): 21-30.