

REVISTA  
DO  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

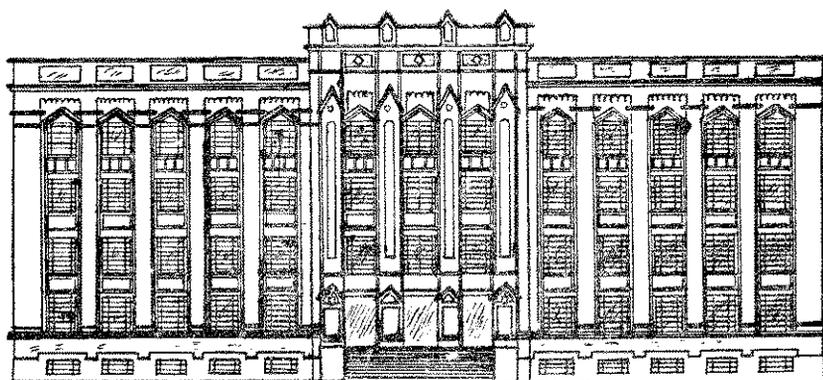
---

VOLUME 21

1961

NÚMERO ÚNICO

---



SÃO PAULO — BRASIL

SECRETARIA DA SAÚDE PÚBLICA E DA ASSISTÊNCIA SOCIAL

INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA  
AV. DR. ARNALDO, 3 - SÃO PAULO

*DIRETOR* — Ariosto Büller Souto

SECÇÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO — Olinda de Camargo

FUNDO DE PESQUISAS — Presidente: Ariosto Büller Souto

LABORATÓRIO DE PESQUISAS BIOQUÍMICAS — Armando R. Taborda

*DIRETORIA DE MICROBIOLOGIA E DIAGNÓSTICO* — Luiz de Salles Gomes

SECÇÃO DE BACTERIOLOGIA — Augusto de E. Taunay

SECÇÃO DE PARASITOLOGIA — Marcelo O. A. Corrêa

SECÇÃO DE VIRULOGIA — Luiz Augusto Ribeiro do Valle

SECÇÃO DE SOROLOGIA — Manoel de Britto e Silva

SECÇÃO DE MICOLOGIA — Hassib Aschar

*DIRETORIA DE BROMATOLOGIA E QUÍMICA* — Mario Sampaio Mello

SECÇÃO DE QUÍMICA FARMACEUTICA — Ernesto Milanese

SECÇÃO DE QUÍMICA BROMATOLÓGICA — Francisco Pedutti

SECÇÃO DE QUÍMICA APLICADA — Mario S. B. Penteado

SECÇÃO DE CONTRÓLES BIOLÓGICOS — Teodosio P. Silva

SECÇÃO QUÍM. BIOLÓGICA E ESPECTROGRAFIA — Waldomiro Pregnotatto

SECÇÃO DE TRIAGEM — Nelma C. Bueno

*DIRETORIA DE PATOLOGIA* — Evandro Pimenta de Campos

SECÇÃO DE ANATOMIA PATOLÓGICA — Antonio J. Brandi

SUBSECÇÃO DE EXAMES HEMATOLÓGICOS — Jarbas A. Viegas

SUBSECÇÃO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL

SUBSECÇÃO DE EXAMES HISTOPATOLÓGICOS E NECRÓPSIAS

LABORATÓRIO DE CANCEROLOGIA EXPERIMENTAL — Juan J. Angulo

*DIRETORIA DE SERVIÇOS TÉCN. E AUXILIARES* — Alberto França G. Martins

SECÇÃO DE ANÁLISES CLÍNICAS — Francisco M. C. Cerqueira

SECÇÃO DE BIOTÉRIO — Eça Pires de Mesquita

SECÇÃO DE MEIOS DE CULTURA — Ettore Rugai

SECÇÃO TÉCNICA — Antonio F. Defina

SUBSECÇÃO DE DESENHO — Emilia A. D'Almeida

SUBSECÇÃO DE ESTATÍSTICA

OFICINAS — José Leone de Paiva

FOTOGRAFIA — Justino da Silva

REVISTA  
DO  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

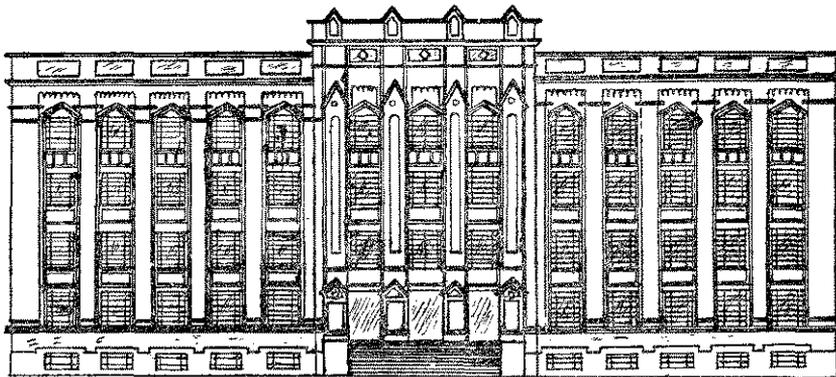
---

VOLUME 21

1961

NÚMERO ÚNICO

---



SÃO PAULO – BRASIL

*REVISTA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ* aparece anualmente, em fascículos ou em um só volume, e tem como diretor responsável o Dr. Ariosto Büller Souto (Carteira de Jornalista n.º 44.282, Reg.º M. T. n.º 8.666, matr. 1.669), auxiliado por uma comissão de três membros, técnicos superiores do Instituto.

*Comissão de Redação*

MARIA ELISA WOHLERS DE ALMEIDA  
EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS  
SILVIO JORDÃO

*A correspondência referente à Revista, assim como publicações destinadas a permuta, deverão ser enviadas para o seguinte enderêço:*

*Secção de Biblioteca e Documentação  
Instituto Adolfo Lutz  
Caixa Postal 7027  
São Paulo — Brasil*

## S U M Á R I O

	<i>Págs.</i>
ETTORE RUGAI — Condicionamento de fezes líquidas para a extração de larvas de <i>Strongyloides stercoralis</i> pelo método de Baermann .....	5
EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS — Pneumonia reumática .....	9
MARCOS FABIO LEON e EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS — Bloqueio aurículo-ventricular total congênito em indivíduo com fibroplastose endocárdica e persistência do conduto arterial. Diagnóstico <i>in utero</i> .....	17
J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR — Soja: origem, composição química, valor nutritivo e aplicações diversas .....	33
MARTHA IRENE MALACHOWSKA, ADELA ROTH e LUIS FLORENCIO DE SALLES GOMES — Produção de "Interferon" e sua ação nas culturas de tecidos .....	57
CLAYDES DE QUADROS ZAMBONI — Estudo sobre a composição de 12 espécies de peixes nacionais — I .....	65
JOSÉ RIBEIRO DO VALLE — Considerações sobre o cânhamo, maconha ou diamba .....	83
CELESTE FAVA NETTO — Contribuição para o estudo imunológico da blastomicose de Lutz (blastomicose sul-americana) .....	99

SECRETARIA DA SAÚDE PÚBLICA E DA ASSISTÊNCIA SOCIAL  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
LABORATÓRIO DE SAÚDE PÚBLICA  
AV. DR. ARNALDO, 3 - SÃO PAULO

SERVIÇO DE LABORATÓRIOS REGIONAIS — Sebastião de Camargo Calazans

LABORATÓRIOS REGIONAIS:

*Santos* — Samuel Augusto Leão de Moura  
*Ribeirão Preto* — Octavio Baracchini  
*Campinas* — Nicolau Biondi Junior  
*Taubaté* — Celso Soares Haberbeck Brandão  
*Bauru* — Romeu Yague  
*São José do Rio Preto* — Francisco Sizenando Teixeira Junior  
*Presidente Prudente* — Luiz Ferraz Sampaio  
*Itapetininga* — Roberto Affonso Placco

LABORATÓRIOS DISTRITAIS:

*Botucatu* — Antonio Maria Roseiro  
*Santo André* — Michael Reiner Schwarzschild  
*Araçatuba* — Elmano Moreira Brandão  
*Marília* — Alaur Inocencio da Silva  
*Franca* — Antonio Tornich

SERVIÇO DE LABORATÓRIOS LOCAIS — Silvio Jordão

DIRETORIA ADMINISTRATIVA — Alvaro de Souza Sanches Filho

SECÇÃO DE PESSOAL — Léa Soli Alves  
SECÇÃO DE ALMOXARIFADO — José Bonini  
SECÇÃO DE RECEBIMENTO DE AMOSTRAS — Leonardo Torres  
SECÇÃO DE REGISTRO GERAL — Ana Fortes do Amaral  
SECÇÃO DE EXPEDIENTE — Manoel C. Cabral  
SUBSECÇÃO DE ARQUIVO — Lourdes Leite Franco  
SUBSECÇÃO DE PROTOCOLO — Maria Amelia V. Cidin  
PROCESSAMENTO DE DESPESA — Virginia De Boni

# CONDICIONAMENTO DE FEZES LÍQUIDAS PARA A EXTRAÇÃO DE LARVAS DE *STRONGYLOIDES STERCORALIS* PELO MÉTODO DE BAERMANN

ETTORE RUGAI \*

É freqüente a necessidade de pesquisa de larvas de *S. Stercoralis* em fezes líquidas. O método de Baermann e suas modificações não pode ser executado com material nessas condições, impossibilitando o uso de uma técnica obrigatória pela sua eficiência, conforme verificaram MORAIS (1948) e COUTINHO *et alii* (1951).

O uso do papel "yes" (fabricado por Johnson & Johnson), de acôrdo com os resultados de FERRIOLI FILHO (1959), baixa a positividade.

O presente trabalho é uma contribuição para solucionar êsse problema.

Várias substâncias espessantes foram experimentadas: serragem de pinho, terra de Füller, fécula de batata, fubá puro, fubá com 10% de carvão vegetal (norit), carboximetil celulose sódica de alta viscosidade, oximetil celulose e gelatina granulada.

O melhor resultado foi obtido com fubá.

## MATERIAL E TÉCNICA

**ESPESSANTE:** fubá comum, passado em tamis n.º 40 e eliminado de partículas menores pelo tamis n.º 60; esterilizado em fôrno Pasteur, a 100°C, por 1 hora.

**FEZES:** foram empregadas fezes não líquidas, homogenizadas e divididas em duas partes, A e B, tanto quanto possível iguais e na quantidade de 5 g, aproximadamente.

A parte A foi extraída como se apresentava, servindo de controle. A parte B foi liquefeita com água e em seguida adicionada

---

\* Chefe da Secção de Meios de Cultura do Instituto Adolfo Lutz.  
Recebido para publicação em 21-10-61.

quantidade suficiente de fubá para torná-la pastosa. Ambas as amostras foram submetidas à extração pelo método de Baermann modificado RUGAL *et alii* (1954), durante 1 hora e 30 minutos, com 8 camadas de gaze de 32 malhas por cm<sup>2</sup>.

O resultado do estudo comparativo de 129 amostras de fezes está expresso no quadro abaixo.

N.º de amostras	positivas		negativas		concordância
	A	B	A	B	
129	68	68	61	61	100%

A = fezes sem fubá

B = fezes com fubá

Houve concordância em 100% dos casos. Em raras amostras o número de larvas era maior em A e em outros em B. Essa diferença deve correr por conta da falta de rigorosa igualdade entre as amostras.

Em alguns casos, partículas de fubá podem dificultar um pouco a observação ao microscópio, razão pela qual novos espessantes estão sendo experimentados.

### RESUMO

O autor estuda uma técnica para executar o método de Baermann com fezes líquidas, condicionando-as com fubá. O estudo foi comparativo. De 129 amostras estudadas, 68 foram positivas e 61 negativas. Houve 100% de concordância entre as amostras com e sem fubá. O método de extração empregado foi o de Baermann modificado (Rugai e col.<sup>4</sup>).

### SUMMARY

A technique was developed for the extraction of larvae of *S. stercoralis* from liquid stools. Flour mayse was used to make the feces past-like.

The comparative study of 129 specimens gives 68 positive results and 61 negative. There was 100% of concordation between the sample with and without flour mayse.

## AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Dr. Marcelo Corrêa que nos franqueou a Secção de Parasitologia para a execução dêste trabalho e ao Dr. Germinio Nazario que sugeriu o uso do Carboximetil celulose.

## BIBLIOGRAFIA

COUTINHO, J. Q.; R. CAMPOS e V. AMATO NETO — 1951 — Nota sôbre o diagnóstico e prevalência da strongiloidose em São Paulo. *Rev. Clin. S. Paulo* 27: 1-10.

FERRIOLI FILHO, F. — 1959 — Diagnóstico da strongiloidíase. Modificação do método de Baermann-Moraes. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo* 1: 138-140.

MORAES, R. G. — 1948 — Contribuição para o estudo de *Strongiloides stercoralis* e da strongiloidose no Brasil. *Rev. Serv. Esp. Saúde Púb.* 1: 507-624.

RUGAI, E; T. MATTOS e A. P. BRISOLA — 1954 — Nova técnica para isolar larvas de nematóides das fezes. Modificação do método de Baermann. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 14: 5-8.



## PNEUMONIA REUMÁTICA \*

### Estudo anátomo-patológico

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS \*\*

Desde longa data são conhecidas as referências sôbre as alterações pulmonares que acompanham a febre reumática. A primeira referência sôbre pleuris e pneumonia foi feita em 1788. Os estudos, dessa época em diante, apresentavam estatísticas muito variáveis, sem correlação anátomo-clínica. Os achados das necrópsias eram confundidos com processos pneumônicos comuns. No século XX, o conceito de pneumonia reumática se firmou, separando-a das alterações pulmonares próprias da insuficiência cardíaca na febre reumática, como o enfarte hemorrágico e as áreas de colapso pulmonar.

Foi RABINOWITZ, em 1926, no estudo da forma aguda da febre reumática, quem separou as manifestações pulmonares reumáticas das alterações encontradas na insuficiência cardíaca. Procuraram, posteriormente, os pesquisadores descrever um quadro típico da pneumonia reumática, citando o aparecimento das membranas hialinas e dos corpúsculos de Masson, como característicos dessa manifestação. Todavia, essas mesmas alterações foram encontradas em outras pneumopatias. As lesões reumáticas do pulmão não são patognomônicas. O conjunto das lesões nos induz até certo ponto a concluir pela etiologia reumática. A presença do nódulo de Aschoff é raridade (SCHMIDT, 1951). A concomitância freqüente do nódulo de Aschoff no miocárdio, na pneumonia reumática, leva-nos a aceitar a mesma etiologia.

---

\* Trabalho da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz e do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (Prof. Constantino Mignone).

\*\* Diretor da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz, Ex-Assistente do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo.

Recebido para publicação em 15 de junho de 1961.

*Formas clínicas:*

Duas formas apresenta o quadro clínico da pneumonia reumática:

1.º — Forma *benigna*, na qual os sintomas não apresentam sinais alarmantes, notando-se início insidioso, febre moderada, dor torácica, intensa, não havendo toxemia e escarros hemópticos. Ritmo respiratório pouco alterado. Sinais poliarticulares. Submacicez das bases, estertores finos disseminados, diminuição do frêmito tóraco-vocal. Esses sinais são de localização migratória, desaparecendo e reaparecendo em outros pontos. Se a lesão do miocárdio não fôr grave, a sintomatologia pulmonar regride facilmente. O quadro radiológico desta forma é pouco significativo.

2.º — Forma *maligna*, apresentando sintomas alarmentes, comprometendo mais as crianças, os jovens e os adultos jovens. Aparece bruscamente dispnéia acentuada, cianose e ortopnéia; a dispnéia é devida à invasão brusca e difusa dos dois pulmões, que têm dificuldade na hematose, em virtude do comprometimento da parede do alvéolo, que se encontra edemaciada, congesta e com infiltrado inflamatório; nos casos mais graves, as pseudo-membranas hialinas impermeabilizam aquela parede; aumenta a taxa de CO<sub>2</sub> no sangue, excitando os centros respiratórios e ocasionando taquipnéia. Frequentemente ocorre a morte. Os medicamentos pouca influência têm nesse quadro, mesmo os cardiotônicos e o O<sub>2</sub>. Atualmente, a transfusão de sangue fresco e a cortisona têm salvo cerca de 50% desses casos. Acompanhando a dispnéia, nota-se sudorese acentuada, agitação ou sonolência e cianose; dores precordiais, expectoração com estrias de sangue. Ao exame físico, notam-se, frequentemente, sinais semelhantes aos do edema agudo dos pulmões, já descritos por DEBRÉ *et alii* (1937), que não regridem com o tratamento e duram horas, até mesmo 24 horas, o que não acontece com o edema agudo. Em geral, os sinais físicos são pobres. O exame radiológico mostra um velamento difuso, com áreas focais lembrando focos broncopneumônicos migratórios.

A pneumonia intersticial da gripe e as pneumonias causadas por outras viroses apresentam alguns aspectos comuns: a) o quadro da pneumonia reumática aparece não só durante o primeiro surto da febre reumática como, também, no transcorrer de outros surtos, podendo preceder à manifestação reumática; b) sempre presente está a insuficiência cardíaca; c) no sangue periférico, verifica-se leucocitose, com neutrofilia alta; d) hemossedimentação elevada.

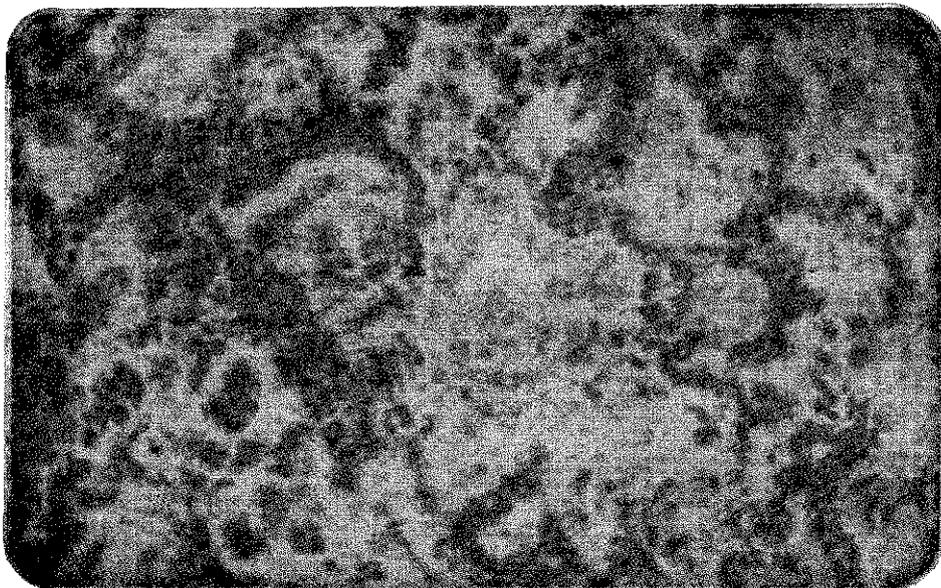


Fig. 1 — Hematoxilina — eosina 60 X. Anscochrome. Corte histológico de pulmão, mostrando aspecto geral do espessamento dos septos pulmonares, à custa de infiltrado celular. Alvéolos ventilados, com algumas células na luz \*

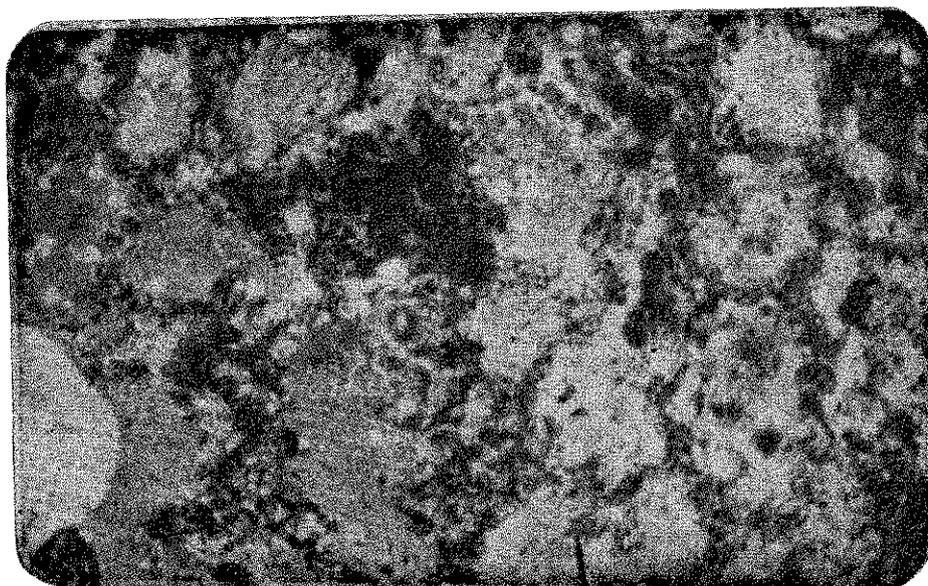


Fig. 2 — Hematoxilina — eosina 60 X. Anscochrome. Corte histológico de pulmão, septos espessados e alveolite serosa predominante, com alvéolos também ventilados

\* Foram aproveitadas, em virtude de sua grande objetividade, as microfotografias de nosso trabalho anterior — Pneumonia Reumática (Nussenzweig *et alii* — 1954 — Arch. Inst. Cardiol. Mex. 24: 55-89).



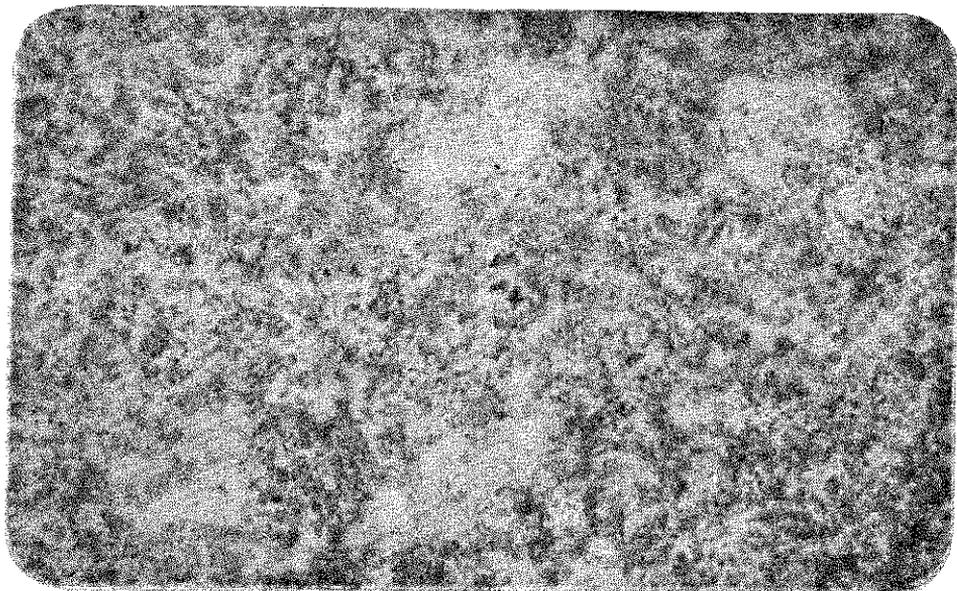


Fig. 3 — Hematoxilina — eosina 60 X. Ansochrome. Corte de pulmão, pneumonia intersticial, pseudomembranas hialinas, alvéolos ventilados com poucas células monocitárias

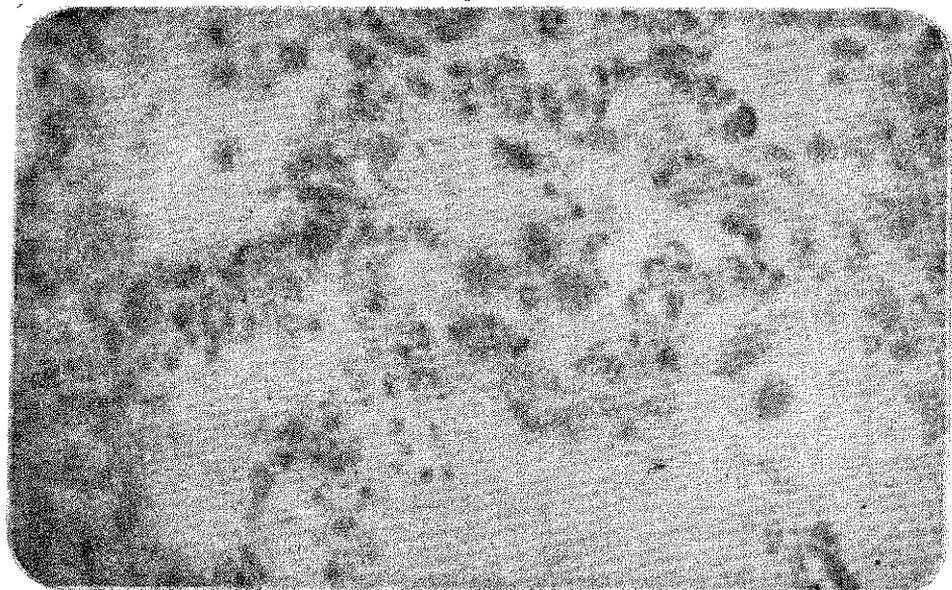


Fig. 4 — Hematoxilina — eosina 600 X. Ansochrome. Alvéolo ventilado, com poucas células monocitárias livres



## MATERIAL DE ESTUDO

Executaram-se as pesquisas das alterações anátomo-patológicas em material recolhido de 10 necrópsias de indivíduos falecidos no Hospital das Clínicas, com o diagnóstico de febre reumática. Fêz-se revisão desse material anteriormente estudado pelo autor e cujas conclusões parciais já foram apresentadas (NUSSENZVEIG *et alii*, 1954). Compararam-se os dados obtidos na presente pesquisa com os obtidos de material retirado de indivíduos falecidos no Hospital de Isolamento "Emílio Ribas", em consequência a viroses outras.

Um estudo comparativo da pneumonia reumática, da pneumonia da gripe, das pneumonias produzidas por outras viroses e das pneumonias plasmocitárias permite incluí-las no grupo da PNEUMONIA INTERSTICIAL. Em tôdas elas encontramos, histologicamente, pouca alteração na luz alveolar, permanecendo ventilados os alvéolos. Os septos, ao contrário, são a sede de alterações primárias, bastante intensas; posteriormente, a luz alveolar é discretamente comprometida. Na complicação pneumônica da gripe, ao lado do comprometimento do septo, constantemente se nota grande quantidade de hemácias. Focos broncopneumônicos hemorrágicos são encontrados com freqüência, isolando-se *Staphylococcus pyogenes*, var. *aureus*, que apresenta grande resistência aos antibióticos comuns.

A pseudomembrana hialina, encontrada na pneumonia reumática, é mais freqüente na pneumonia gripal e rara nas pneumonias produzidas pelo sarampo, psitacose ou nas complicações pulmonares das viroses dermatrópicas. As pneumonias anafiláticas produzidas por sulfas apresentam aspectos bastante parecidos com a pneumonia reumática (MOSSBERGER, 1947).

## ALTERAÇÕES ANÁTOMO-PATOLÓGICAS

As alterações verificadas na pneumonia reumática atingem sempre os dois pulmões. Os lobos inferiores são as áreas mais acometidas. Focos com aspecto hemorrágico são encontrados dispersos. Nos casos mais graves, nota-se alteração difusa do órgão.

Microscopicamente, o pulmão apresenta-se armado, de coloração vermelho-escuro, com áreas violáceas. A consistência é firme e elástica, lembrando a da borracha, não se notando friabilidade. A pleura é lisa quando se instala o primeiro ataque da febre reumática, apresentando espessamentos e aderências quando o processo é recidivante. Notam-se focos de aspecto hemorrágico. As superfícies

de corte apresentam-se brilhantes, vermelho-escuras, com áreas variando de intensidade até o violáceo. A compressão dá saída a pouco líquido avermelhado, diferindo, fundamentalmente, do edema agudo do pulmão. Quando existe associação piógena secundária, nota-se friabilidade do foco broncopneumônico e fornecimento de líquido turvo pela raspagem, enquanto que esta fornece pouco líquido na forma não complicada. *O pulmão reumático se apresenta com esplenização.*

Microscopicamente, as alterações encontradas são difusas, variando de intensidade. Alguns autores descrevem-nas como mais intensas na periferia do pulmão.

As alterações iniciais se encontram nos septos alveolares, portanto, lesão intersticial, e posteriormente na luz alveolar e nos brônquios.

**ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NOS SEPTOS** — Nota-se espessamento difuso devido ao edema, à congestão ativa, à lesão das paredes dos vasos e à presença de células inflamatórias.

O edema produz afrouxamento dos elementos constituintes dos septos, sobressaindo sua estrutura. Notam-se, então, os vasos cheios de hemácias e bem desenhados. Lesão difícil de ser verificada é a necrose fibrinóide de parede arteriolar. Esta seria, na realidade, a lesão inicial: aceitando a enfermidade como uma *colagenose*, o tecido colágeno de parede arteriolar seria a sede do choque antígeno-anticorpo, produzindo a necrose fibrinóide. Esta se apresenta, então, formada por diminutos grânulos brilhantes, eosinófilos e que se coram positivamente pelos corantes da fibrina, como a hematoxilina fosfotúngstica e pelo P.A.S. Logo em seguida, haveria multiplicação de elementos celulares, predominando as células mononucleares, aparecendo poucas células pequenas como linfócitos, neutrófilos e plasmócitos. Num estágio final, haveria trombose do vaso comprometido.

**ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NOS ALVÉOLOS** — Quase ao mesmo tempo em que se processam alterações intersticiais, vão se instalando, nos alvéolos, outras alterações, sem contudo interromper a ventilação intra-alveolar. Em uma primeira fase nota-se exsudato seroso, em meio ao qual existe uma ou outra grande célula mononuclear, raramente binucleada, células do revestimento alveolar descamadas, e hemácias. Instala-se assim a alveolite serosa. Posteriormente, aquêle exsudato seroso se transforma, em parte, em exsudato serofibrinoso ou fibrinoso, sempre pobre em células, constituindo a alveolite fibrinosa. A fibrina em seguida se condensa,

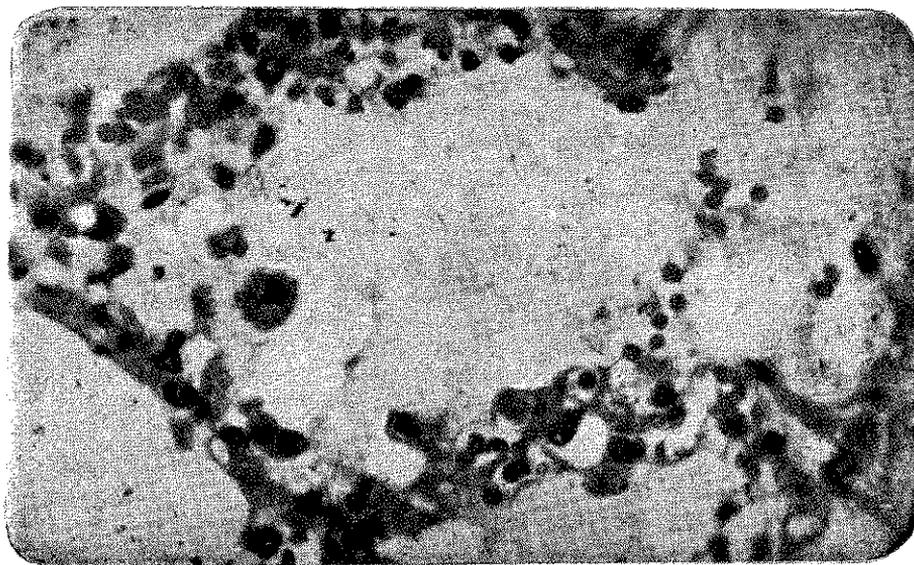


Fig. 5 — Hematoxilina — eosina 600 X. Ansochrome. Corte de pulmão. Espessamento do septo alveolar, com infiltrado celular, luz alveolar livre, com raras células grandes, mononucleares

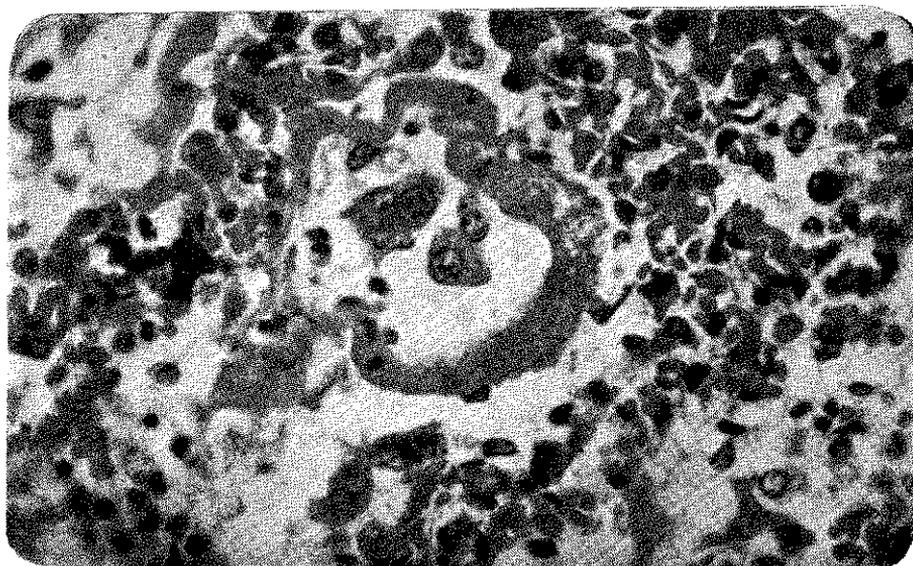


Fig. 6 — Hematoxilina — eosina 600 X. Ansochrome. Corte de pulmão. Alvéolo pulmonar ventilado, com várias células histiocitárias, células de Aschoff, e massa eosinófila, formando pseudomembrana hialina, livre na luz



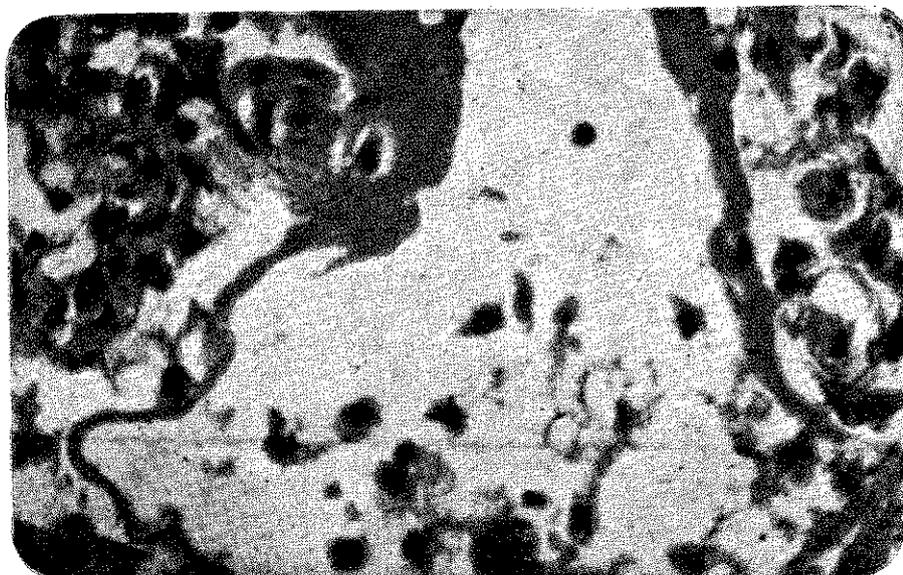


Fig. 7 — Hematoxilina — eosina 600 X. Ansochrome. Corte de pulmão, Alvéolo ventilado, agrupamento de células mononucleares livres e pseudomembrana hialina impermeabilizando o alvéolo

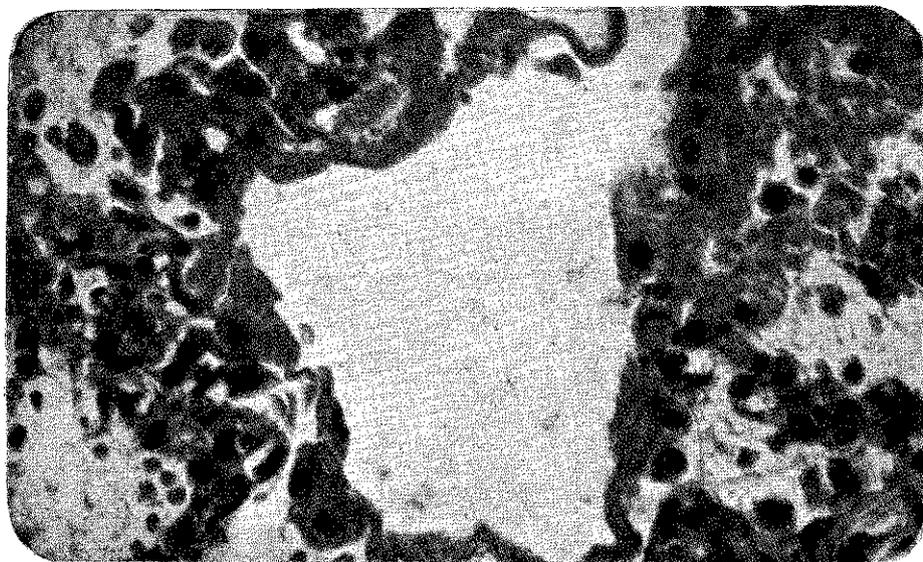


Fig. 8 — Hematoxilina — eosina 600 X. Ansochrome. Corte de pulmão, alvéolo ventilado, impermeabilização de parede alveolar por pseudomembrana hialina, ausência de células na luz e infiltrado de células mononucleares, linfócitos e congestão, produzindo espessamento da parede (interstício) alveolar



formando massas, aumentando então o número de grandes células mononucleares. Estas se reúnem ou se multiplicam e procuram envolver possivelmente as massas fibrinosas, lisando-as à custa de lisinas por elas secretadas. Não encontramos aqui os gigantócitos de tipo corpo-estranho, apesar da presença dessas massas, mas sim células sinciciais com poucos núcleos, células que, em certas condições, se apresentam com os mesmos caracteres das células de Aschoff, encontradas no nódulo reumático do miocárdio. Em algumas ocasiões, tomam aspecto macrofágico, idêntico ao encontrado no coração. Em determinadas condições, conseqüentes à taquipnéia e à inspiração profunda de ar pelo doente, produz-se uma compressão mecânica da fibrina, que se condensa, se hialiniza e pode se acolar junto à parede alveolar, constituindo as *pseudo-membranas hialinas* já referidas, que se apresentam acentuadamente eosinófilas, homogêneas, de espessura variável, livres de células em sua intimidade. A patogenia dessas pseudo-membranas, além do que acima dissemos, processa-se, conforme assinala FRASER (1930), à custa da fusão do citoplasma das células necrosadas provenientes da parede alveolar ou ainda, segundo opinião recente, por intermédio das plaquetas. O rompimento da parede alveolar, com destruição das fibras elásticas, produz pequenos focos de enfisema e, nestas condições, a pseudo-membrana pode revestir extensões maiores. Posteriormente estas fibras elásticas se condensam — elastose — dando ao pulmão a consistência de borracha. O exsudato intra-alveolar pode ser organizado, aparecendo um tecido conjuntivo jovem, rico em fibroblastos que, após reabsorverem aquêle exsudato, aparecem sob forma de corpúsculos, preenchendo os alvéolos e mesmo os bronquíolos, presos por um pedículo à parede alveolar. Essas formações são chamadas corpos de Masson e foram estudados por êste autor e colaboradores, em casos de pneumonia reumática (MASSON *et alii*, 1937).

**ALTERAÇÕES BRONQUIAIS** — Os achados mais comuns são constituídos de descamação do epitélio de revestimento bastante acentuado, formando exsudato catarral, algumas hemácias e células mononucleares. A parede brônquica apresenta infiltrado linfocitário e, às vezes, lesões destrutivas. A dispnéia provoca freqüentemente aspiração do exsudato para os ramos mais finos, produzindo obstruções bronquiolares. Nos períodos crônicos, após a organização desse exsudato, aparecem os corpos de Masson, idênticos aos observados nos alvéolos.

**ALTERAÇÕES PLEURASIS** — São pouco acentuadas, constituindo, na fase aguda, focos de pleurites serosa e fibrinosa, com

acentuada congestão capilar, responsável, às vezes, pelo aspecto hemorrágico do líquido pleural, quando existente. Na fase crônica, reduzem-se às aderências pleurais ou espessamentos focais da pleura.

**ALTERAÇÕES ENCONTRADAS NO TECIDO CONJUNTIVO E ELÁSTICO** — Ultrapassadas as fases do período agudo da pneumonia reumática, nas quais aparecem as alterações dos septos e dos alvéolos com a multiplicação dos elementos celulares assinalados, encontramos o período subagudo no qual desaparecem êsses elementos celulares e iniciam-se os processos de fibrosa e de elastose, para encontrarmos terceiro período, crônico, no qual o tecido elástico proliferou, constituindo a elastose característico da fase crônica dessa alteração. As paredes alveolares se encontram espessadas e as células do revestimento alveolar tornam-se cubóides. Pelo método de Van Gieson, verifica-se aumento difuso do tecido conjuntivo colágeno e as fibras elásticas coradas se mostram espessadas e em fragmentos. Na forma crônica, entre nós estudada por BARROS *et alii* (1945), pode haver aparecimento de focos de reagudização.

**COMPLICAÇÃO** — Apesar da gravidade da pneumonia reumática, ela se agrava ainda mais com o progredir da insuficiência cardíaca e com a superjunção de bactérias piógenas, formando focos broncopneumônicos isolados ou confluentes. Casos graves são aquêles em que grandes áreas dos pulmões estão comprometidas pela presença de pseudomembranas hialinas. Difícil se torna a hematose e a oxigenoterapia. Esta última, apesar de observadas as condições técnicas existidas, falha de maneira inesperada, conduzindo o enfêrmo à morte por asfixia.

## DISCUSSÃO

A pneumonia reumática é, pois, um comprometimento grave dos pulmões no transcorrer da febre reumática, apresentando-se sob forma de pneumonia intersticial, com achados anátomo-patológicos não patognomônicos, porém sugestivos quando estão presentes conjuntamente. O agravamento do quadro se processa com a superjunção de bactérias piogênicas e com o aumento das áreas afetadas pelas pseudomembranas hialinas. Apesar de a ventilação intra-alveolar se encontrar pouco alterada e os sinais semiológicos físicos pouco pronunciados, o doente se apresenta com um quadro clínico geral grave, condicionado pelas alterações pulmonares, que impedem a hematose satisfatória. Os próprios quadros radiológicos apresentam alterações discretas que podem ser incluídas nos grupos das **ALTERAÇÕES RADIOLÓGICAS FUGAZES**.

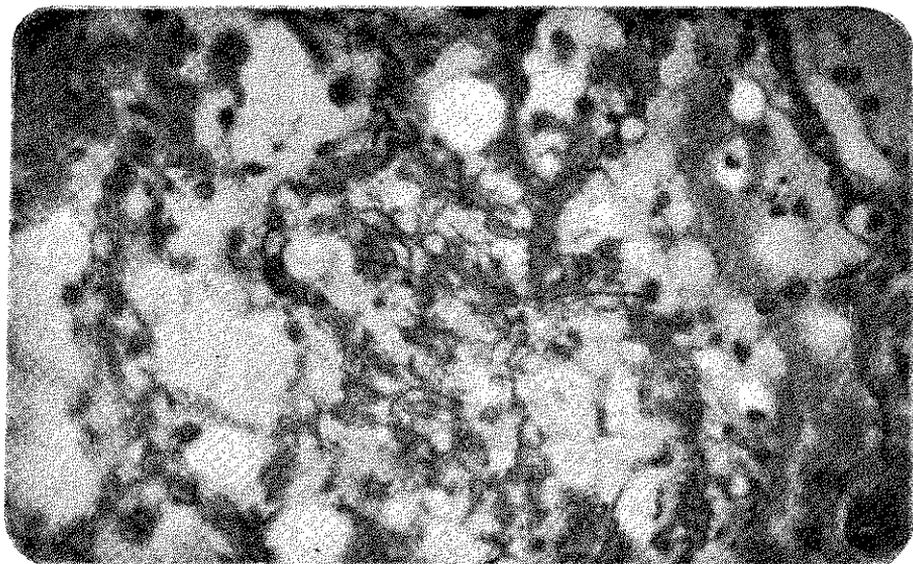


Fig. 9 — Coloração pelo método de Perdrau. Anscochrome. Corte de pulmão. Fragmentação de retículo, fase prévia à formação do enfisema focal



Fig. 10 — Coloração pela Hematoxilina-eosina 100 X. Anscochrome. Corte de pulmão. Bronquíolo com exsudato catarral inspirado. Nota-se o epitélio brônquico enchendo a luz, e conservação do epitélio local



A ausência dos nódulos de Aschoff e da necrose fibrinóide não impede o diagnóstico anátomo-patológico de pneumonia reumática. O diagnóstico diferencial com a pneumonia primária atípica, isoladamente, sem outros dados, oferece certas dificuldades. O mesmo não acontece com as outras pneumonias viróticas, como a do sarampo, a da citomegalia e com a pneumonia pneumocística, esta caracterizada pela presença dos plasmócitos nas traves e massas de aspecto de favo de mel, formadas pelos acúmulos parasitários na luz dos alvéolos e dos brônquios.

### RESUMO

O autor apresenta estudo anátomo-patológico da pneumonia reumática, feito em material colhido de enfêrmos falecido com febre reumática e comparado com material proveniente de diversos pacientes com pneumonia intersticial, inclusive a forma pneumônica da gripe "asiática". Verificaram-se alterações dos septos, luz alveolar, brônquios e pleuras e modificações conseqüentes.

Os achados anátomo-patológicos permitem incluir a pneumonia reumática, a pneumonia atípica, as pneumonias por outras viroses e a pneumonia pneumocística no grupo das pneumonias intersticiais, notando-se características peculiares em cada uma. A lesão principal localiza-se no septo, que se torna espêsso, congesto e apresenta infiltrado monocitário. Os alvéolos apresentam luz permeável, poucas células monocitárias e, posteriormente, pseudo-membranas hialinas; num estágio final, elastose do tecido pulmonar e espessamento pleural. A junção de bactérias piogênicas aumenta a gravidade do quadro, produzindo focos broncopneumônicos.

### SUMMARY

A pathological study of rheumatic pneumonia is made in material from 10 fatal cases. A comparison is also made with other interstitial pneumonias, including the pneumonic form of "Asian" influenza. Changes in the septa, alveolar lumen, bronchi and pleura were found. The findings suggest that rheumatic pneumonia, influenzal pneumonia, atypical pneumonia and pneumocystic pneumonia may be included among interstitial pneumonias although characteristics peculiar to each of these may be recognized.

The chief lesion is found in the septum which is thickened and becomes congested showing a monocytic infiltrate. The alveoli

exhibit a cleared lumen with some monocytic cells but later show hyaline pseudo-membranes and, finally, elastosis of lung tissue and thickening of pleuras. The severity of the clinical picture increases when pyogenic bacteria are superimposed thus giving rise to bronchopneumonic foci.

### BIBLIOGRAFIA

BARROS, O. M. *et alii* — 1945 — Pneumonia reumática. An. Fac. Med. Univ. S. Paulo 21: 257-89.

BLYSTAD, W., B. H. LANDING & C. A. SMITH — 1951 — Pulmonary hyaline membranes in newborn infants. Pediatrics 8: 5-21.

DEBRÉ, R. *et alii* — 1937 — Pneumonie rhumatismale. Presse Med. 45: 273-6.

FRASER, A. D. — 1930 — The Aschoff nodule in rheumatic pneumonia. Lancet 1: 70-2.

MASSON, P., J. L. RIOPELLE & P. MARTIN — 1937 — Poumon rhumatismal. Ann. Anat. Path. 14: 359-82.

MOSSBERGER, J. I. — 1947 — Rheumatic pneumonia (Report of two cases). J. Pediat. 30: 113-22.

NUSSENZVEIG, I. *et alii* — 1954 — Pneumonia reumática. Arch. Inst. Cardiol. Mex. 24: 55-89.

RABINOWITZ, M. A. — 1926 — Rheumatic pneumonia. J. A. M. A. 87: 142-44.

SCHMIDT, H. — 1951 — Zur Kenntnis der rheumatischen interstitiellen Pneumonie. Deut. Med. Woch 76: 365-6.

# BLOQUEIO AURÍCULO-VENTRICULAR TOTAL CONGÊNITO EM INDIVÍDUO COM FIBROPLASTOSE ENDOCARDÍACA E PERSISTÊNCIA DO CONDUTO ARTERIAL

Diagnóstico *in utero* \*

MARCOS FABIO LION \*\*

EVANDRO PIMENTA DE CAMPOS \*\*\*

A fibroelastose endocárdica ocorre associada a cardiopatias congênitas, ou surge como entidade isolada, discutindo-se, neste caso, a etiologia congênita ou adquirida. Publicou-se muito sobre o assunto, ainda que sejam raros os trabalhos onde há associação do processo de fibroelastose endocárdica com a persistência do conduto arterial.

De outro lado, são inúmeros os casos divulgados de bloqueio aurículo-ventricular total na primeira infância, com a hipótese de que este distúrbio do ritmo seja consecutivo a transtornos ocorridos durante a gestação. Entretanto, os casos em que há suspeita de bloqueio aurículo-ventricular total durante a gestação, pela baixa frequência das pulsações fetais cardíacas e confirmação, após o nascimento, pelo electrocardiograma, são mais raros.

Em nosso paciente, suspeitou-se da existência do bloqueio aurículo-ventricular total durante a gestação, e a criança era porta-

---

\* Trabalho do Serviço de Cardiologia do Departamento de Medicina (Serviço do Prof. Luiz V. Décourt) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; do Departamento de Anatomia Patológica (Serviço do Prof. Constantino Mignone) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Publicado em Arch. Inst. Card. Mex. 30: 1960.

\*\* Do Serviço de Cardiologia (Prof. Luiz V. Décourt). Ex-residente interno do I.N.C., México, D.F.

\*\*\* Do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da USP (Serviço do Prof. Constantino Mignoni) e Diretor da Diretoria de Patologia do Instituto Adolfo Lutz. Patologista agregado ao Serviço do Prof. Luiz Décourt.

Recebido para publicação em 24 de julho de 1961.

dora de fibroelastose endocárdica congênita e persistência do conduto arterial. A raridade dessa associação animou-nos a publicar o caso.

Em 1928, AYLWARD publicou um caso de bloqueio aurículo-ventricular total, com frequência ventricular de 48 pulsações por minuto, e diagnóstico feito durante a gestação. O paciente tinha irmão, também, com bloqueio aurículo-ventricular total, o que é particularidade interessante.

Em 1930, LEECH publicou caso de bloqueio aurículo-ventricular total, associado a persistência do conduto arterial, com diagnóstico feito quando o paciente tinha cinco anos e meio de idade. Neste caso, supunha-se bloqueio aurículo-ventricular total congênito, não havendo verificação antes do nascimento. Quanto à persistência do conduto arterial, não houve comprovação anátomo-patológica.

SANKEY, em 1948, encontrou na literatura 10 casos de bloqueio aurículo-ventricular total, cujo diagnóstico poderia ser previsto antes do parto, visto a menor frequência ventricular, após o nascimento, ser de 40 pulsações por minuto. A estes 10 casos, juntou um de sua experiência. Em nenhum deles, há menção à presença de conduto arterial persistente ou de fibroelastose endocárdica.

Em 1950, STADLER *et alii* publicaram caso de bloqueio aurículo-ventricular total, cuja frequência ventricular mais baixa foi de 42 pulsações por minuto. Fêz-se o diagnóstico de bloqueio, durante a gestação. A necrópsia revelou hipertrofia de ambos os ventrículos, dilatação da aurícula direita e do ventrículo direito, e fibroelastose endocárdica.

KELLY & ANDERSEN, em 1956, fizeram revisão bibliográfica sobre a fibroelastose endocárdica e publicaram 2 casos desta enfermidade, com grande comprometimento do ventrículo direito e do ventrículo esquerdo, associado a bloqueio aurículo-ventricular total. A frequência cardíaca mais baixa encontrada foi de 28 por minuto.

Também, em 1956, SANTORO estudou caso de fibroelastose endocárdica, com envolvimento de todo o coração, e bloqueio aurículo-ventricular total, suspeitando-se do diagnóstico durante a vida intra-uterina.

Recentemente, em 1957, DEVITT & PINTO publicaram caso semelhante.

#### OBSERVAÇÕES DO PACIENTE

*Antecedentes familiares:* mãe de 35 anos de idade; teve febre reumática aos 25 anos, de curta duração, sem seqüelas cardíacas. Nessa ocasião fêz amigdalectomia. O pai, há 9 anos, teve tuberculose

pulmonar, seguida de cura. Primeira gestação. Examinada periodicamente, durante a gestação, até o 5.º mês. Nesta ocasião apresentava auscultação normal do foco fetal. Na véspera do parto, que chegou a término, verificou-se a frequência de pulsações do foco fetal, sendo de 40 por minuto, em ritmo regular. O parto foi normal. A mãe não sofreu infecção ou traumatismo durante a gravidez.

*Histórico da doença atual:* paciente do sexo feminino, raça branca, pesando 1.920 g ao nascer. Chorou imediatamente após o nascimento e não apresentou cianose. No exame clínico, não se encontrou nada de anormal, com exceção dos dados do aparelho cardiovascular. Verificou-se bradicardia acentuada, com frequência cardíaca de cerca de 25 pulsações por minuto. Não apresentou frêmitos ou sôpros e os ruídos cardíacos eram normais, ainda que intensos, durante algumas revoluções cardíacas. As artérias dos membros superiores e inferiores eram palpáveis e o pulso normal. Não se tomou a pressão arterial. Não se verificaram sinais de insuficiência cardíaca.

O electrocardiograma, nesta ocasião, mostrou bloqueio aurículo ventricular total e hipertrofia ventricular esquerda. Em consequência da bradicardia, colocou-se a menina em incubadora com oxigênio.

No terceiro dia de vida, uma chapa do tórax mostrou cardiomegalia acentuada, sem alterações pleuropulmonares, ou da parede costal.

No quarto dia de evolução, escutou-se sopro sistólico, em todo o precórdio. No 5.º dia de vida, apareceu sopro diastólico, audível também, em toda a região precordial. Os componentes sistólico e diastólico do sopro separavam-se pelo segundo ruído, não havendo, portanto, o caráter de sopro contínuo. No 6.º dia, além de acentuada bradicardia persistente e da presença dos sopros, verificou-se a aparição de extrassístoles freqüentes. O electrocardiograma, nesta ocasião, mostrou bloqueio aurículo-ventricular total e hipertrofia ventricular esquerda, com extrassístoles ventriculares freqüentes. Nova radiografia do tórax, aos 12 dias, mostrou aumento da área cardíaca. Aos 15 dias de vida, desapareceram as extrassístoles e o ritmo se regularizou. Desde então, a frequência ventricular variou de 27 a 35 pulsações por minuto.

Durante toda a evolução da doença da paciente, houve pouco aumento de peso, variando de 1.920 a 2.120 g.

Do 20.º dia em diante, apresentou ligeira diarréia e discreta icterícia. No 35.º dia, continuava a diarréia, acentuando-se, ligei-

ramente, a icterícia. Diagnosticou-se desidratação; em palpções, verificou-se o fígado a 3 dedos do bordo costal direito, e o baço a um dedo do bordo costal esquerdo. No 36.º dia, apareceu dispnéia intensa, coriza e tiragem acentuada. A menina faleceu, com o peso de 1.970 g.

*Exames complementares:*

*Hematócrito* (2.º dia) — 55%

*Hemocitológico* (20.º dia)

Eritrócitos: 4.900.000/mm<sup>3</sup>. Hemoglobina: 16,2 g/% = 101%.

Leucócitos: 6.000/mm<sup>3</sup>, com contagem diferencial normal para a idade.

*Hemocitológico* (35.º dia)

Hemoglobina: 11,3 g % = 71%

Leucócitos: 12.300/mm<sup>3</sup>.

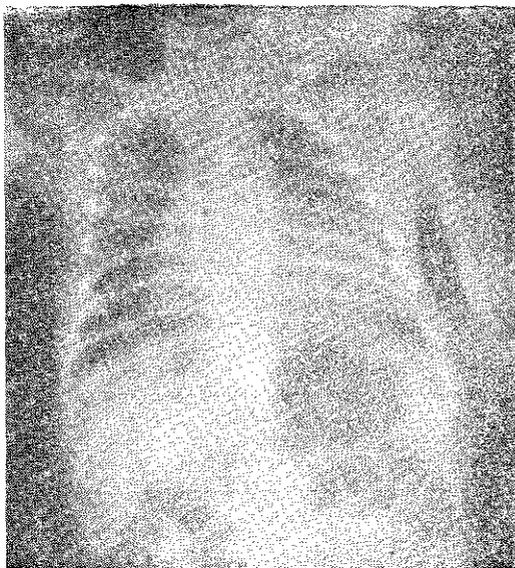


Fig. 1 — Radiografia do tórax, pósterio-anterior.  
Terceiro dia de vida

*Radiografia do tórax* (3.º dia): cardiomegalia acentuada, principalmente no ventrículo esquerdo. Campos pulmonares normais (figura 1).

Electrocardiograma (1.º dia) — Bloqueio aurículo-ventricular total, com freqüência auricular de 125 por minuto e freqüência ventricular de 25 por minuto. O foco da origem do ritmo ventricular encontrava-se situado antes da bifurcação do Feixe de Hiss. QRS; 0,7 seg. SAP a + 80°, dirigido para trás. Ondas P difásicas, aumentada em D1, diminuída em V1, V2 e V3, com depressões em V4 e V5, e com ápice em D2, D3 e VF; duração de 0,055 seg. e voltagem de 3,2 mm em D2. SAQRS a + 30°, dirigido para trás. Complexo rS de V1 a V5, ondas S com depressões em V4 e V5. Onda "R" pura em V6. SAT a + 40°, orientado para frente. Ondas T positivas de V1 a V6.

*Conclusão:* Bloqueio aurículo-ventricular total. Ritmo idio-ventricular com origem acima da bifurcação do feixe de Hiss. Hipertrofia ventricular esquerda (fig. 2).

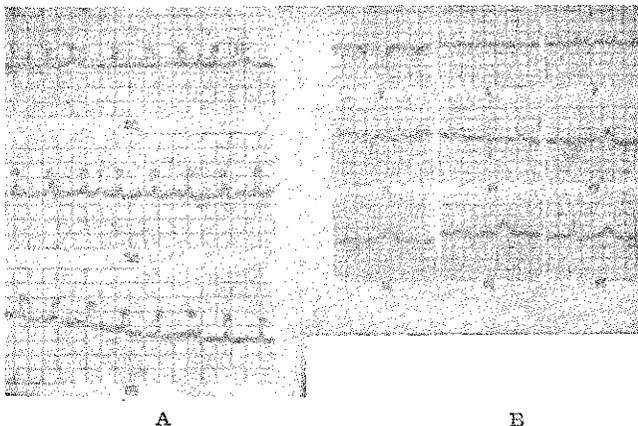


Fig. 2 — Electrocardiograma. Primeiro dia de vida

Electrocardiograma (6.º dia) — Em comparação com as gravações anteriores, nota-se o aparecimento de complexos ventriculares extensos, empastados, prematuros, com provável foco de origem no ventrículo esquerdo (fig. 3).

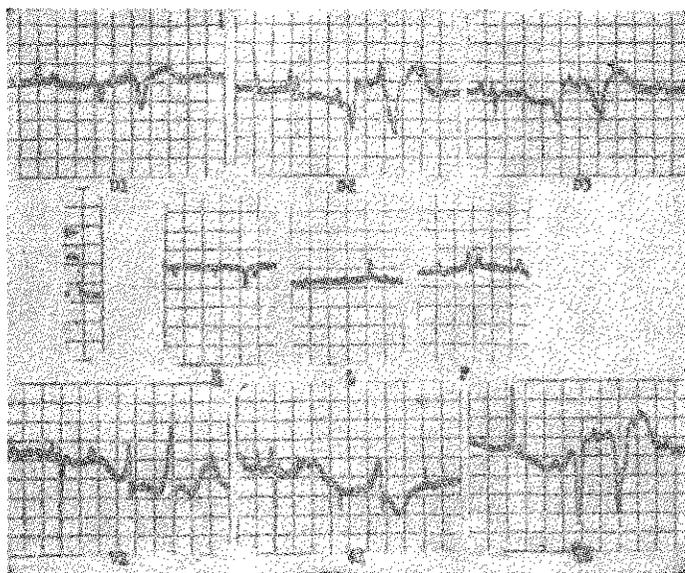


Fig. 3 — Electrocardiograma. Sexto dia de vida

Electrocardiograma (35.º dia). Em comparações com as gravações anteriores, observa-se o desaparecimento das extrassístoles.

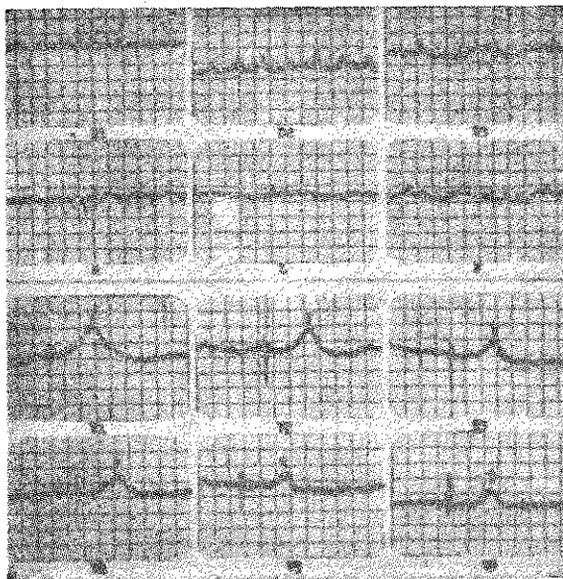


Fig. 4 — Electrocardiograma. Trigésimo quinze dia de vida

Aumento da freqüência auricular a 170 por minuto. AP passou de  $+80^\circ$  a  $+60^\circ$ . Diminuição da voltagem da onda P em V1 e V2. Aparecimento dos complexos rSr' em V6 (transtornos da condução intra-ventricular de estímulo?) (fig. 4).

Terapêutica: A criança recebeu ácido pangâmico (vitamina B 15), na dose de 10 mg/24 horas, intramuscular, do 3.º ao 15.º dia. Alimentação feita com leite em pó.

#### *Exame anátomo-patológico:*

Coração de forma globular, com volume aumentado, principalmente no ventrículo esquerdo; 27 g de peso (normal, cêrca de 20 g).

Ventrículo esquerdo: endocárdio ligeiramente fibroso em toda a extensão. Músculos papilares, ligeiramente hipertróficos e lisos. Colunas carnosas lisas. Miocárdio pálido com ligeiras áreas levemente amarelas. Epicárdio liso e brilhante. Capacidade muito aumentada.

Aurícula esquerda: endocárdio, ligeiramente fibroso. Capacidade pouco aumentada. Discreta hipertrofia.

Ventrículo direito: endocárdio, discretamente fibroso. Colunas carnosas e músculos papilares aumentados e lisos. Capacidade aumentada.

Aurícula direita: endocárdio normal. Capacidade pouco aumentada. Discreta hipertrofia.

Espessura do miocárdio no ventrículo direito: base 2 mm; parte média 1,5 mm; ápex 1,5 mm.

Ventrículo esquerdo: via de saída 33 mm, via de entrada 33 mm.

Ventrículo direito: via de saída 42 mm, via de entrada 25 mm.

Válvula pulmonar: 19 mm. Válvula aórtica: 18 mm. Válvula tricúspide: 40 mm.

Vasos da base: ligeira dilatação da porção inicial da aorta, medindo 2,5 cm de diâmetro. Conduto arterial persistente, de 5 mm de comprimento e diâmetro exterior de 2 mm (figs. 5, 6, 7 e 8).

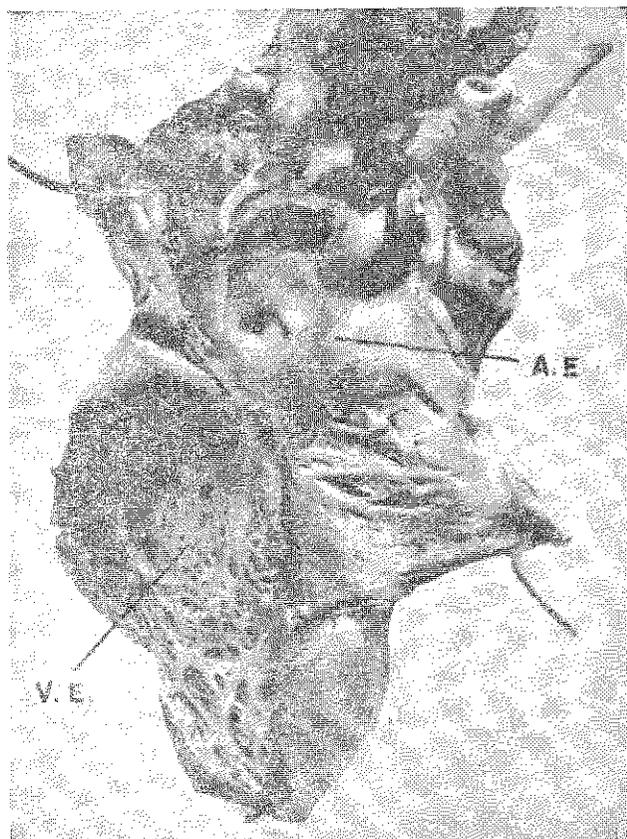


Fig. 5 — Na parte inferior, ventrículo esquerdo dilatado e hipertrófico. Na parte superior, aurícula esquerda dilatada. Ausência de comunicação inter-auricular.

V. E.: ventrículo esquerdo. A. E.: aurícula esquerda

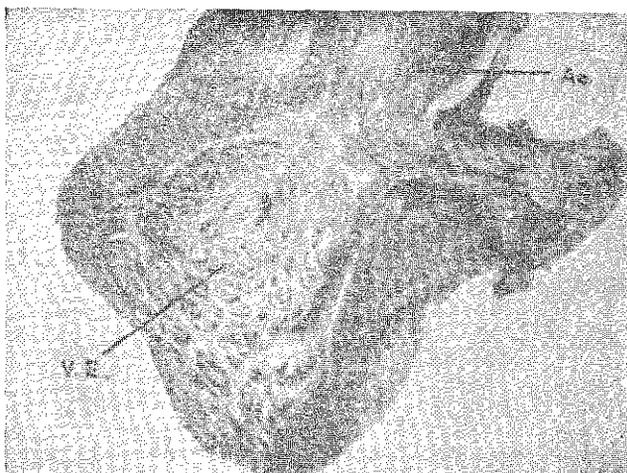


Fig. 6 — Ventriculo esquerdo e porção inicial da aorta. Fibroelastose endocardiaca. Colunas carnosas lisas. Ventriculo esquerdo hipertrófico. Ausência de comunicação inter-ventricular

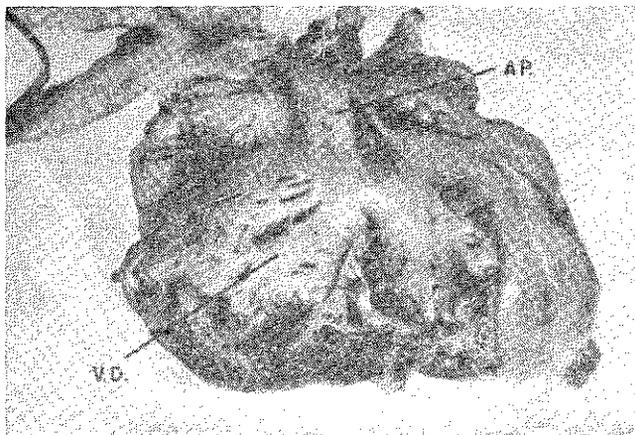


Fig. 7 — Ventriculo direito aberto e porção inicial da artéria pulmonar. Ventriculo direito hipertrófico e dilatado. Endocárdio de aspecto fibroso. Ausência de comunicação inter-ventricular. Orifício pulmonar normal.  
V. D.: ventriculo direito. A. P.: artéria pulmonar

*Conclusão:* hipertrofia e dilatação globais do coração, com predomínio da dilatação, principalmente do ventrículo esquerdo. Persistência do conduto arterial. Fibroelastose endocárdica, com exceção da aurícula direita.

*Exame histopatológico:* Fizeram-se cortes do coração nas áreas correspondentes ao nódulo de Keith-Flack, ao nódulo de

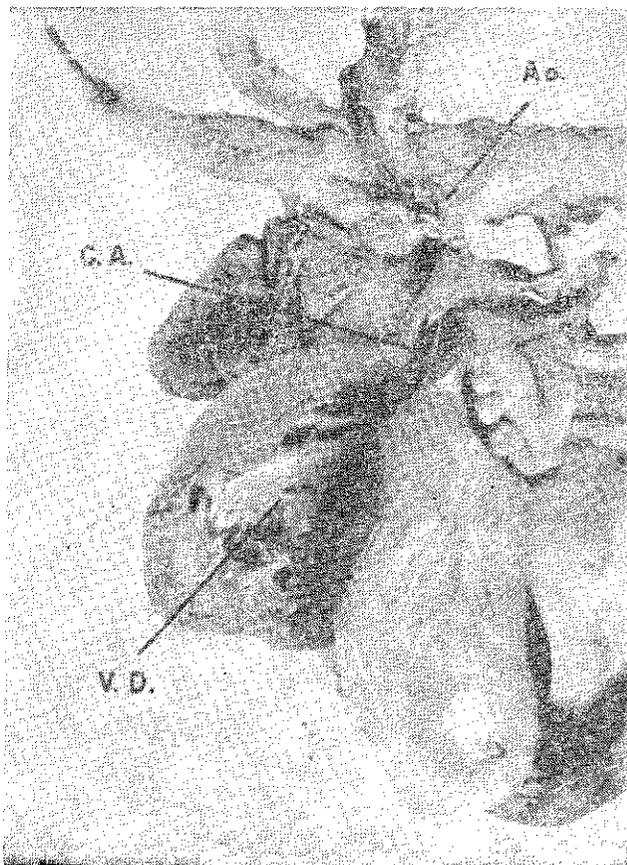


Fig. 8 — Ventrículo direito aberto, mostrando evidente hipertrofia. Na parte superior da figura a aorta com ramos iniciais. Assinalado com estilete, o conduto arterial persistente. V. D.: ventrículo direito. Ao: aorta. C. A.: conduto arterial

Aschoff-Tawara, ao feixe de Hiss e ramificações. Colheram-se fragmentos dos dois ventrículos e de ambas as aurículas. Colorações: com hematoxilina-eosina, o miocárdio; com Weigert, as fibras elásticas; e com van Gieson, o tecido conjuntivo.

A dissecação macroscópica do sistema condutor do coração, feita depois de fixação com auxílio de lupa, ofereceu dificuldades em virtude da difícil identificação do tecido. As colorações dos cortes das regiões do sistema condutor não oferecem meios para verificação, sob o ponto de vista histológico.

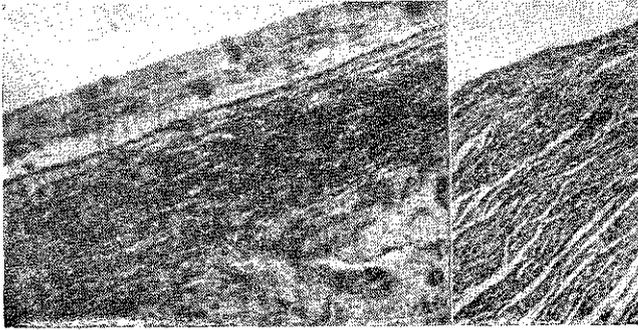
Ao exame histológico, o tecido endocárdico mostrou-se espesso, facilmente visível pela hematoxilina-eosina. As colorações específicas de Weigert e de van Gieson demonstraram ser o espessamento produto da presença de fibras conjuntivas e de fibras elásticas, em maior quantidade, na parede do ventrículo esquerdo, que em outras áreas. Esse espessamento mostrou ser 10 vezes maior que o de um coração normal do mesmo pêso e de igual idade. No coração normal, observou-se, somente, uma delgada capa de tecido conjuntivo, com poucas fibras elásticas. As amostras aproveitadas para comparação foram colhidas da face anterior do ventrículo esquerdo. Verificou-se facilmente esse espessamento nas outras regiões, não sendo, entretanto, tão acentuado como no ventrículo esquerdo. O tecido endocárdico das colunas carnosas e músculos papilares demonstrou acentuado espessamento (figs. 9 e 10).



A

B

Fig. 9 — a) Corte da parede ventricular esquerda, face anterior. Espessamento do endocárdio. Fibras elásticas e conjuntivas grandemente aumentadas (fibroelastose endocárdica). b) Corte da parede ventricular esquerda, face anterior. Indivíduo normal da mesma idade e com o mesmo pêso. Endocárdio de espessura normal. Aum. oc. 10 x obj. 10. Col. Weigert — van Gieson



A

B

Fig. 10 — a) Corte do ventrículo direito. Espessamento do endocárdio. Fibras elásticas e conjuntivas aumentadas. Fibroelastose endocárdica. b) Corte do miocárdio do ventrículo direito, de indivíduo normal, da mesma idade e com o mesmo pêso. Endocárdio com espessura normal. Aum. oc. 10 x obj. 10. Col. Weigert — van Gieson

Concluimos que se trata, anátomopatologicamente, de coração com fibroelastose endocárdica, localizada, principalmente, no ventrículo esquerdo.

### COMENTÁRIOS

O caso é sumamente raro, pois não encontramos semelhante na literatura. As observações seguintes merecem menção particular:

- a) suspeitou-se de bloqueio aurículo-ventricular total, durante a gestação. A freqüência cardíaca que, na véspera do parto, era de 40 pulsações por minuto, demonstrou ser a mesma, pelo electrocardiograma, no primeiro dia de vida;
- b) a freqüência ventricular foi, no primeiro dia, de 25 pulsações por minuto, portanto, mais baixa do que a encontrada em crianças da mesma idade. A maioria dos casos publicados referem freqüência de 27 a 40 pulsações por minuto;
- c) interpretou-se, inicialmente, o sôpro sistólico, audível em todo o precórdio, que apareceu no 4.º dia da evolução, como devido à cardiopatia congênita, talvez do tipo de comunicação intercavitária, por ser a associação mais comum, proveniente da insuficiência mitral funcional ou, ainda, da estenose relativa do orifício aórtico, resultante da bradicardia e da acentuada hipertrofia e dilatação do

ventrículo esquerdo. O aparecimento do sôpro diastólico fêz-nos pensar na possibilidade de conduto arterial persistente, o que foi confirmado na necrópsia. A inaudibilidade dos sopros sistólico e diastólico, nos primeiros dias, seria provável conseqüência do equilíbrio das pressões dos círculos aórtico e pulmonar. Com a eventual queda da pressão sistólica pulmonar, conseqüência da diminuição normal da resistência no território pulmonar, apareceu o sôpro sistólico e mais tarde, com o desequilíbrio tensional durante a diástole, apareceu o sôpro diastólico. A ausência de cianose, durante tôda a evolução da enfermidade, falou em favor de um curto-circuito artério-venoso pelo conduto arterial;

- d) as radiografias do tórax mostraram sempre acentuada cardiomegalia, aparentemente a expensas de tôdas as câmaras, mas com indiscutível predomínio do ventrículo esquerdo, o que poderia relacionar-se com o fato de ser aqui a fibroelastose mais acentuada. A avaliação da magnitude da circulação pulmonar foi difícil, devido à cardiomegalia extensa;
- e) o electrocardiograma mostrou, desde o princípio, bloqueio aurículo-ventricular total, com freqüência auricular, praticamente normal, para a idade; freqüência ventricular extremamente baixa e franca hipertrofia ventricular esquerda;
- f) pela evolução da paciente, verificou-se muita dificuldade para ganhar pêso. Faleceu com desidratação e icterícia. O exame anátomo-patológico do fígado e das vias biliares revelou, unicamente, trombos biliares intra-hepáticos;
- g) apesar da falta de convicção sôbre a ação específica do ácido pangâmico, administrou-se vitamina B<sub>15</sub> à paciente, como última tentativa para melhorar as condições do miocárdio;
- h) no exame anátomo-patológico, chamaram a atenção a extensa cardiomegalia, o conduto arterial persistente e a fibroelastose endocardiaca em ambos ventrículos e aurícula esquerda, com predomínio do ventrículo esquer-

do. Não se verificou nenhum outro defeito congênito do coração. O volume do coração era 4 vezes maior que o normal, para pacientes da mesma idade e do mesmo peso. Havia hipertrofia do miocárdio, com espessamento 2 vezes maior que o normal. Apesar disso, notava-se dilatação de todas as cavidades cardíacas. O exame não ofereceu meios para identificação do sistema condutor, visto o coração haver sido dissecado após fixação, o que impediu ulterior impregnação desse órgão pelo lugol.

### RESUMO

Os autores descrevem a associação rara de vários defeitos congênitos do coração: bloqueio aurículo-ventricular total, fibroelastose endocárdica e persistência do conduto arterial. Suspeitou-se de bloqueio aurículo-ventricular total, durante a gestação, pela baixa frequência cardíaca do foco fetal. Confirmou-se o bloqueio, no primeiro dia de vida, pelo electrocardiograma. A frequência ventricular, nesta ocasião, foi extremamente baixa, 25 pulsações por minuto. Confirmou-se a fibroelastose endocárdica pelo exame necrótico macro e microscópico, havendo envolvimento dos dois ventrículos e da aurícula esquerda, sendo mais intenso no ventrículo esquerdo. O tamanho do coração era cerca de 4 vezes o tamanho normal, com ligeiro aumento de peso. O miocárdio do ventrículo esquerdo era 2 vezes mais espesso, e o endocárdio cerca de 10 vezes mais espesso que o normal. O conduto arterial era patente. A criança, prematura, viveu 36 dias e faleceu com quadro de desidratação.

### SUMMARY

The authors present the case of a rare association of several congenital heart malformations: a complete A-V block, an endocardial fibroelastosis and a patent ductus arteriosus.

The complete atrioventricular block had been suspected during pregnancy by the low heart rate of the fetus. It was confirmed on the first day of life with electrocardiogram.

The heart rate was extremely low, with a ventricular rate of 25 beats per minute.

Endocardial fibroelastosis was confirmed by the macro and microscopical examination. Both ventricles and the left auricle were involved. It was more marked on the left ventricle. The size of the heart was four times the normal size; its weight was lightly increased. The myocardium of the left ventricle was twice as thick as normal and its endocardium ten times as thick as normal. The ductus arteriosus was patent.

The child was born prematurely and lived 36 days. She died as a result of extreme dehydration.

### SOMMAIRE

Les auteurs présentent une rare association de plusieurs anomalies congénitales du coeur; bloc auriculo-ventriculaire total, fibro-élastose endocardiaque et persistance du canal artériel. Le bloc auriculo-ventriculaire total avait été suspecté pendant la grossesse, en raison de la basse fréquence des pulsations du fœtus. Le premier jour après la naissance, on a eu confirmation du bloc auriculo-ventriculaire par l'électrocardiogramme. Il faut souligner la fréquence ventriculaire extrêmement basse, de 25 battements par minute. La fibro-élastose endocardiaque fut confirmée à la nécropsie, par des examens macro et microscopiques. Elle existait dans les deux ventricules et dans l'oreillette gauche. La taille du coeur était près de 4 fois celle d'un coeur normal, avec une légère augmentation du poids. Le myocarde du ventricule gauche était deux fois plus gros et son endocarde près de 10 fois plus épais que le normal. Le canal artériel était persistant. L'enfant, du sexe féminin, né prématurément, vécut 36 jours et mourut au cours d'un état de déshydratation.

### BIBLIOGRAFIA

- AYLWARD, R. D. — 1928 — Congenital heart block. *Brit. M. J.* 1: 943.
- DEVIIT, R. E. & C. J. PINTO — 1957 — Congenital heart block due to endocardial fibroelastosis interpreted as foetal distress. *J. Obst. & Gynaec. Brit. Emp.* 64: 885-7.
- KELLY, J. & D. H. ANDERSEN — 1956 — Congenital endocardial fibroelastosis. II. A clinical and pathological investigation of those cases without associated cardiac malformations including report of two familiar instances. *Pediatrics* 18: 539-55.

LEECH, C. B. — 1930 — Congenital complete heart block. Report of a case with an associated patent ductus arteriosus. *Am. J. Diseases Children* 39: 131-140.

SANKEY, A. O. *et alii* — 1948 — Congenital heart simulating foetal distress. A report of two cases. *Brit. M. J.* 2 (4579): 676-7.

SANTORO, E. V. — 1956 — Congenital endocardial fibroelastosis and total heart block. Report of case. *Arch. Pediat.* 73: 94-98.

STADLER, H. E., C. A. REID & H. P. FRIEDMAN — 1950 — Prenatal fibroelastosis ("fetal endocarditis") manifested clinically by total heart block. *J. Pediat.* 36: 370-5.



# SOJA: ORIGEM, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, VALOR NUTRITIVO E APLICAÇÕES DIVERSAS \*

J. B. FERRAZ DE MENEZES JÚNIOR \*\*

## SOJA

*Glycine max* (L.) Merrill

Leguminosas (Papilionáceas)

*Sinonímia científica* — *Glycine soja* Siebold et Zuccarini — *G. hispida* Maxim — *Soja hispida* Moench — *Soja japonica* Savi — *Dolichos soja* L. Alguns autores citam *Glycine soja* como classificada por Benth.

*Sinonímia vulgar* — Feijão soja, feijão japonês e soja (Brasil e Portugal), *soybean* (Inglaterra e Estados Unidos), *sojabohne* e *coya* (Alemanha), *yeu-teou* (China), *daizu* e *mane* (Japão), soja e *pois chinois* (França), soja (Espanha, Argentina), soja e *pisello oleaginoso* (Itália). Possui ainda os epítetos de “Carne Vegetal”, “Cinderela da Agricultura”, “Vaca da China”, “Carne sem ôsso”.

A soja é planta anual, de porte herbáceo (de 0,80 a 1,5 m de altura), nativa da China e constitui um dos mais importantes alimentos do homem, principalmente no Oriente.

As sementes, ricas em substâncias nutritivas, vêm sendo utilizadas, desde épocas bastante afastadas, por quase todos os povos da superfície da terra.

A cultura da soja, iniciada há séculos na China, estendeu-se, logo após, à Mandchúria e, em seguida, à Coréia.

Já ao tempo do imperador Shenung, no ano de 2838, antes de Cristo, a China cultivava a soja.

\* Trabalho apresentado e aprovado em Sessão do II Congresso Brasileiro de Nutricionistas, em São Paulo, em julho de 1960.

\*\* Químico do Instituto Adolfo Lutz.

Recebido para publicação em 6 de agosto de 1961.

JAMIESON (1943) acredita que ela tenha sido usada e provavelmente cultivada pelo homem primitivo. LI-YU-YING assevera que referências encontradas há 5.000 anos anteriores aos nossos dias confirmam ou, quando não, contribuem para esta assertiva.

Como acontece com as plantas de grande importância, cujo cultivo vem se processando por dilatado período através dos tempos, a soja reuniu extenso número de espécies e variedades, de modo a serem contadas aos milhares.

Segundo ECKEY (1954), tudo faz crer que a soja hoje cultivada tenha se derivado de sua ancestral *Glycine ussuriensis* Regel et Maack, espécie silvestre de porte, hábitos e características diferentes das diversas espécies cultivadas.

*Taxionomia* — A nomenclatura da soja tem sido modificada por diversas vezes, desde Linneu, razão pela qual os vários nomes científicos propostos, até então, permanecem ainda como sinônimos da leguminosa. RICHER & MORSE (1948) e MORSE (1950), entretanto, afirmam que a denominação taxionômica mais recente e autorizada de acôrdo com as regras internacionais é: *Glycine max* (L.) Merril.

SAMPAIO (1940), em seu trabalho sôbre a soja, apresenta uma relação cronológica de diversos nomes científicos emprestados a êsse prodigioso “feijão”:

*Phaseolus max* L. (1753)

*Dolichos soja* L. (1753)

*Soja hispida* Moench (1794)

*Soja japonica* Savi (1824)

*Glycine soja* Siebold et Zuccarini (1845)

*Soja angustifolia* Miguel (1855)

*Glycine ussuriensis* Regel et Maack

*Soja max* Piper (1914)

*Glycine max* Merril (1917)

A soja é atualmente cultivada, mesmo em escala modesta, em quase tôdas as regiões do globo onde o clima o permita.

Muito embora seja planta de origem tropical, adapta-se perfeitamente às regiões temperadas e até às de clima frio.

O interêsse geral pela produção da soja se fundamenta no real valor desta incomparável semente, considerada um dos alimentos mais completos, pelo seu elevado teor de proteínas, gorduras, sais minerais e vitaminas.

Os maiores produtores mundiais de soja são, pela ordem de importância: a Mandchúria, a China, o Japão e a Coréia, seguindo-se-lhes, em escada menor, os Estados Unidos, a Rússia, as Índias Neerlandesas, a África, alguns países da Europa (Itália, França, Áustria) e América do Sul.

A introdução da soja nos Estados Unidos se fez por intermédio de navios americanos que, no início do século XIX, escalavam os portos da China, porém, só por volta de 1882, os agricultores americanos se interessaram pelo seu cultivo. Já em 1925, depois de aclimatadas algumas variedades, a produção dos Estados Unidos começou a criar vulto para, nos dias de hoje, atingir centenas de milhares de toneladas anuais, da preciosa papilionácea.

No Brasil, as primeiras plantações de soja foram iniciadas no Estado de São Paulo, por volta do ano de 1921, em colônias japonesas, por meio de sementes fornecidas pelo Ministério da Agricultura, então interessado na disseminação de sua cultura. Hoje a produção, entre nós, já é bastante significativa e tendente a ampliar-se cada vez mais, em futuro próximo, dado o reconhecimento que se começa a ter do incontestável valor nutritivo da soja, da importância dos seus produtos e subprodutos de larga aplicação industrial, do seu emprêgo na pecuária (forragens e rações para animais) e, ainda, como agente fertilizante das terras.

Várias campanhas oficiais têm sido feitas ultimamente no sentido de que a soja venha a fazer parte integrante da alimentação quotidiana do brasileiro, suprindo, desta forma, o teor de proteínas que falta, geralmente, em nossos alimentos.

São de SAMBAQUY (1957) os seguintes trechos, extraídos de seu interessante trabalho "Soja — Carne Vegetal":

"Não poderemos deixar de aludir ao papel de grande destaque que poderá desempenhar a soja na alimentação do povo brasileiro.

O problema de falta de alimentos, que é uma conjuntura do mundo moderno, agrava-se bastante entre nós que somos um país em que as dificuldades de produção, transporte e distribuição de gêneros e de produtos alimentícios são imensas e em que há um impressionante desequilíbrio entre o poder aquisitivo das populações e o valor dos comestíveis.

E como para complicar ainda a situação, justamente os chamados alimentos protéicos, que constituem a base da alimentação racional, são os que com maior frequência se encontram deficientemente representados no regime comum da maioria dos habitantes de inúmeras regiões do nosso território".

No Rio Grande do Sul, já constitui a soja cultura de primordial importância econômica, ao mesmo tempo em que no norte do Paraná e em São Paulo vem se desenvolvendo promissoramente.

O Governo do Estado de São Paulo acaba de aprovar importante programa da Secretaria da Agricultura, visando ao fomento da produção da soja e sua utilização como alimento e como matéria prima de inúmeros produtos industriais, devendo, para tal, contar com a colaboração das Secretarias da Saúde Pública e da Assistência Social, e da Educação.

**VARIETADES** — É muito grande o número de variedades de soja cultivadas nas diversas regiões do globo, principalmente em se tratando de planta que se destina não só à alimentação do homem, mas empregada, também, como alimento do gado e como excelente fertilizante do solo.

Os diversos tipos de soja se diferenciam principalmente pelo ciclo vegetativo, porte, conformação, cor das sementes, proporção de óleo e proteína. Sendo planta de ciclo vegetativo rápido, é comumente usada em cultura rotativa com outras plantas, como o trigo, o milho, o algodão, etc. A planta requer de 75 a 200 dias para completar o ciclo vegetativo, respectivamente curto ou longo, até o completo amadurecimento das sementes.

As principais variedades cultivadas, de acordo com SAMBAQUY (1957), são as seguintes:

*Para a alimentação humana* — Willomi, Imperial, Hokkaido, Jogun, Funk delicious, Fugi, Bensei, Higan, Illini, Illington, Easy-cook, Hahto, Hoosier, Mammoth yellow, etc.

*Para a alimentação do gado, etc.* — Minsoy, Mammoth brown, Yokoten, Austin, Mandarin, Midwest, Dixie, Arlington, Dunfield, Mammoth yellow, etc.

PAULA (1958) faz menção às seguintes variedades cultivadas no Estado de Minas Gerais: Biloxi, Edna, Abura, Santa Maria (preta) e Mammoth (amarela).

Para forragens, são usadas a Oototan, a Virgínia e outras, sob a forma de feno ou de silagem.

Para fins industriais, são preferidas a Ocuth e a Edna, pelo elevado teor em óleos e proteínas.

Em São Paulo, o crescente interesse despertado pela cultura da soja, nestes últimos anos, levou o Instituto Agrônomico de Cam-

pinas a realizar vários ensaios visando ao seu comportamento em nosso meio e melhoramento de variedades já existentes no Estado, e importadas. MIYASAKA (1954), da Secção de Genética daquele Instituto, selecionou, após experimentações, as 18 seguintes variedades: Abura, Ootootan, Seminole, Palmeto, C.N.S., I.A. 455, Acadian, La 41-1219, Nova Granada, Yelnando, Paraná Tardia, Pereira Barreto, Paraná Precoce, Avaré Precoce, Cotia 14, Aliança, Aliança Preta e N 47-3332. Estas variedades apresentam sementes de cor amarela ou preta; pubescência da planta, marrom ou branca; altura da planta, de 70 a 135 cm; ciclo (semeação à colheita), de 98 a 180 dias; teor de óleo da semente, de 16,4 a 20,5%; teor de proteína, de 37,5 a 44,4%. As variedades Nova Granada, Pereira Barreto, Paraná Tardia, I.A. 455, Yelnando e La 41-1219 foram as mais produtivas nas condições dos ensaios realizados pelo referido autor.

SILVA *et alii* (1952) fizeram observações com a finalidade de selecionar variedades de soja resistentes aos nematóides das galhas das raízes, visto as variedades Abura e Rio Grande, atualmente cultivadas no Brasil e, ainda, outras em estudo, serem bastante suscetíveis ao ataque de algumas formas do *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White), CHITWOOD (1949). Este nematóide, que tem sido, também, assinalado em tubérculos de batatinha, ocasionou sérios prejuízos aos plantadores de soja, em anos anteriores.

As variedades consideradas resistentes à infestação por esse parasito, são as seguintes: Palmetto, N 45-3799, La 41-1219 e Ootootan.

São tantas as variedades de soja e tão diversas as suas formas e características, que uma geral descrição dificilmente poderá ser feita.

#### MORFOLOGIA DO FRUTO E DAS SEMENTES DE SOJA —

O fruto é legume linear, ligeiramente arqueado, revestido de pêlos rudes e longos, pardo-avermelhados; possui de 2,5 a 8 centímetros de comprimento, apresenta alguma semelhança com a vagem do lupino (tremoço) e contém duas, raramente três ou quatro sementes (fig. 1).

A semente, irregularmente ovóide ou esférica, conforme a variedade, não tem a forma de rim, como os feijões comuns, ao contrário, é larga lateralmente e apresenta contorno uniforme e arredondado. Mede de 10 a 12 mm de comprimento, tem a pele (espermoderma) colorida de amarelo, vermelho, verde, pardo, prêto,

ou matizada de côres diferentes; hilo distinto, de 3 a 4 mm de amplitude, com margens bem marcadas e estrofiolo apenas perceptível. Os cotilédones são grandes, ricos em proteínas e em matéria graxa e comumente isentos de amido.

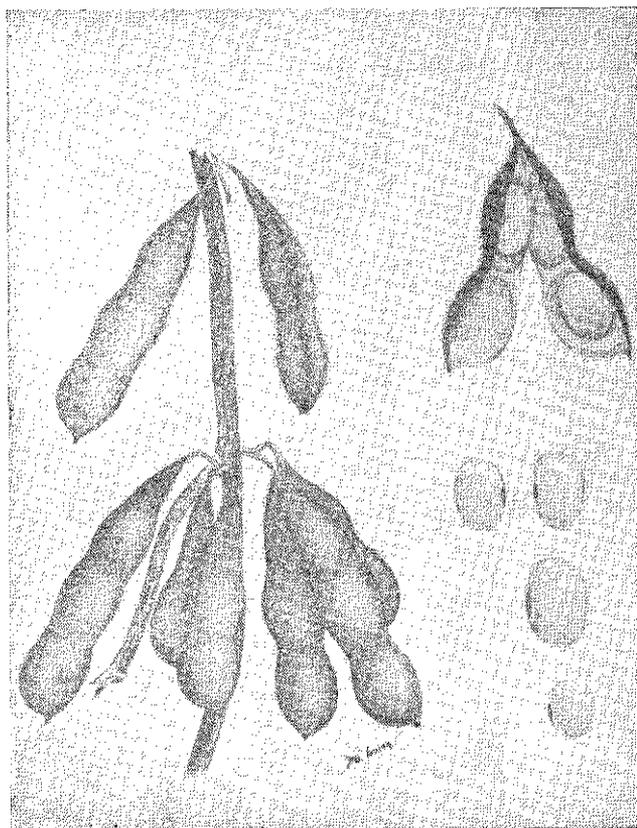


Fig. 1 — Fruto e sementes de soja (400 x). Original (desenho de M. Luiza)

**AMIDO** — Tem sido motivo de especial interêsse a questão da presença ou ausência de amido nos cotilédones das sementes de soja. Muitos investigadores, como HAGER (1942), WINTON (1932), e outros, mencionados por WINTON, são unânimes em afirmar a ausência de amido na soja. Alguns especialistas no assunto, e entre êles KONDO, STREET & BAILEY, acreditam que o amido seja constituinte normal das sementes de soja. Em amostras de soja procedentes do Japão e da China, Kondo (citado por Winton) encontrou a presença de amido em algumas variedades de diferentes côres:

- semente amarela do Japão — pequena quantidade de amido;
- semente amarela da China — ausência de amido;
- semente preta do Japão — grande quantidade amido;
- semente preta da China — ausência de amido;
- semente verde do Japão — muito pequena quantidade de amido;
- semente verde da China — ausência de amido;
- semente vermelha do Japão — muito pequena quantidade de amido;
- semente parda do Japão — ausência de amido.

Pelo quadro exposto, o referido autor chegou à conclusão de que as variedades chinesas estudadas não apresentavam conteúdo amilífero nas sementes.

Quanto às de origem japonesa, somente uma revelou presença de grande quantidade de amido, as demais continham pequena ou muito pequena quantidade, e uma, ausência de amido.

Entre as incontáveis variedades de soja, é muito natural que algumas revelem presença de amido. Entretanto, em amostras não só de sementes como de farinha de soja, por nós examinadas na Seção de Microscopia Alimentar do Instituto Adolfo Lutz, em todo o longo período de rotina, não foi verificada a presença de amido em seus elementos histológicos. Raríssimas vêzes, aliás, tivemos oportunidade de observar, no exame microscópico de algumas farinhas de soja, a presença de escassos grãos de amido, de diminuto tamanho, esparsos no campo microscópico e reconhecidos, unicamente sob a ação do lugol, de modo a dar-nos a impressão de se tratar mais de contaminação acidental do produto do que mesmo de constituinte normal do parênquima cotiledonar da soja.

É fato evidente que as sementes verdes ou imaturas de soja realmente apresentam amido nos tecidos, porém, *em pequena quantidade*, como afirmam vários autores. Por esta razão, algumas farinhas de soja, preparadas com sementes maduras e secas, mas trazendo de permeio sementes verdes ou imaturas, podem conter traços de amido (fig. 2).

**ESTRUTURA MICROSCÓPICA — ESPERMODERMA — a) paliçada** — formada por células grandes, esclerificadas, retangulares, alongadas, apresentando luz que é distintamente bem aberta na base e se estreita, uniformemente, até se tornar afilada em seu término, nas proximidades da epiderme externa, à semelhança de sovela;

possuem de 30 a 60 $\mu$  de altura por 6 a 20 $\mu$  de largura e, nas proximidades do hilo, alcançam 60 e até 80 $\mu$  de altura; b) *epiderme externa da paliçada* — apresenta-se sob a forma de tecido constituído por células anulares e de paredes grossas; c) *epiderme interna da paliçada* — constituída por células elipsóides ou isodiamétricas, de paredes grossas, semelhantes a grãos de amido de feijão ou de lentilha, com estreita abertura linear, raiada, na parte central; d) *subepiderme* — exibindo células em forma de grandes carretéis ou de ampulhetas, ajustadas umas ao lado das outras, com espaços

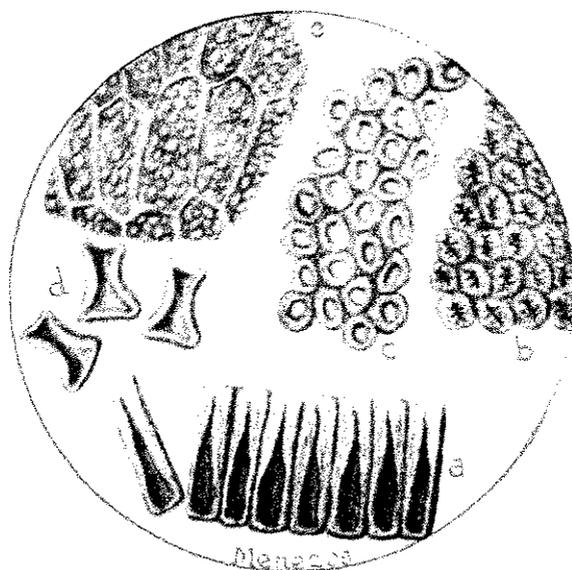


Fig. 2 — Elementos histológicos da semente de soja (400 x). Original

intercelulares elipsóides e tendo, cada, a parte superior mais estreita que a inferior. Estas células são das mais características, observadas nas subepidermes do respectivo grupo das *Leguminosas* — *Papilionáceas*, principalmente pelo considerável tamanho, que alcança a altura de 70 a 80 $\mu$  por 40 $\mu$  de largura, podendo atingir 110 e até 115 $\mu$  ao redor do hilo. EMBRIÃO — e) células de paredes finas dos cotilédones, de forma poligonal, alongadas, formando paliçada e com reserva aleuro-oleosa.

MENEZES JÚNIOR (1952), em seu trabalho “Fraudes do Café”, lembra a estreita harmonia que guardam, entre si, os representantes de gêneros e famílias de muitas plantas. Entre as *leguminosas*,

a soja, o fedegoso e o feijão comum conservam traço de união muito grande, muito embora pequenos caracteres diferenciais existentes lhes permitam a identificação microscópica, não só pelos tecidos do espermoderma, como pela marcante especificidade estrutural dos embriões. Quanto à presença de amido nos cotilédones da soja, continua dizendo o autor, "nas células do embrião da soja, usualmente, não encontramos amido e sim aleurona e matéria graxa. Há algumas variedades de soja procedentes do Japão que apresentam pequena porção de amido em seu conteúdo celular aleuro-oleoso". HAGER (1942) menciona que as células paliádicas das sementes escuras possuem matéria corante que, nas sementes negras, aparecem de côr violeta escura.

COMPOSIÇÃO QUÍMICA — Em análises feitas no Laboratório da antiga Estação de Cana e Sementes Oleaginosas de Piracicaba, Estado de São Paulo, em amostras procedentes do Campo de Sementes São Simão, LOBBE (1935) encontrou os seguintes resultados percentuais:

VARIETADES	Água %	Matéria Graxa %	Proteí- nas %	Carbo- ídratos %	Celulo- se %	Cinza %
Peking .....	11,38	16,71	29,08	32,91	4,44	5,48
Wilson Five .....	11,43	15,88	35,36	27,37	5,01	4,95
Minsoy .....	10,99	19,29	28,93	30,32	5,31	5,15
Dunfield .....	11,80	21,28	38,13	19,38	4,68	4,72
Mandarim .....	10,92	19,45	34,70	27,74	5,36	4,80
Haberlandt .....	9,80	18,65	35,18	26,90	5,01	4,46
Virgínia .....	11,20	18,26	34,86	25,05	4,31	5,32
Habaro .....	10,02	19,85	33,60	27,11	4,80	4,62
Dixie .....	10,96	19,35	35,36	25,46	4,51	4,36
Mammoth yellow .	10,00	20,10	36,59	23,70	5,02	4,58

PAULA (1937) refere-se, em excelente trabalho sôbre a soja, às análises feitas no Instituto Nacional de Tecnologia, em amostras

da produção dos Campos de Sementes de Sete Lagoas (Minas Gerais) e de Ponta Grossa (Paraná), com os seguintes resultados, por cento:

VARIETADES	Água %	Matéria Graxa %	Proteí- nas %	Carbo- idratos %	Celu- lose %	Cinza %
Aksarben amarela .	8,33	20,64	33,28	28,28	4,60	4,82
Edano amarela ...	8,27	19,89	31,00	32,50	3,82	4,50
Hermann amarela .	6,14	15,08	32,20	38,46	3,80	4,32
Mammoth amarela	10,05	20,41	38,94	21,80	5,88	4,10
Mammoth amarela	7,40	16,44	33,20	34,39	4,21	4,36
Mammoth marrom	7,88	17,46	31,82	34,19	4,35	4,30

JAMIESON (1943) reporta-se a análises de grande número de amostras de soja procedentes dos Estados Unidos, com as seguintes percentagens: água 5,5 a 9,4%; matéria graxa 12,0 a 24,0%; proteínas 30,0 a 50,0%; cinza 3,3 a 6,4%. A média de proteína é de 42,0% e de óleo é de 18,0%.

CONSTITUINTES MINERAIS — São de JAMIESON & MCKINNEY (1935) os seguintes resultados indicando a percentagem dos constituintes minerais da soja: CaO—0,50 a 0,63%; MgO—0,45 a 0,55%; K<sub>2</sub>O—2,0 a 2,6%; Na<sub>2</sub>O—0,19 a 0,46%; P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>—1,5 a 2,2%.

Os mesmos autores examinaram amostras de diferentes variedades comerciais e encontraram de 0,078 a 0,150% de fosfátidos, valores que, calculados em lecitina, deram respectivamente de 2,0 a 3,82%.

Alguns tratadistas referem-se a outros minerais com as seguintes percentagens: enxôfre, 0,40%; ferro, 0,007%; manganês, 0,003%; cobre, 0,001%.

BETHLEM *et alii* (1952), em estudos sôbre feijões, dão para os principais constituintes minerais da soja, os seguintes valores:

S O J A		CaO	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Fe	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Ma
Variedades	Procedência	g%	g%	mg%	mg%	mg%
Soja .....	R. Grande do Sul	0,075	0,872	3,760	5,376	4,160
Arksoy .....	São Paulo .....	0,357	1,294	3,840	5,491	5,000
Rio Grande do Sul	São Paulo .....	0,333	1,252	11,340	16,216	3,400
Pereira Barreto ....	São Paulo .....	0,485	1,291	10,202	14,614	3,300
Georgian .....	São Paulo .....	0,396	0,110	6,000	8,580	3,740
Acadian .....	São Paulo .....	0,170	0,598	3,000	4,290	4,060
Abura .....	São Paulo .....	0,044	1,110	11,340	16,216	4,200
Chosen-prêto .....	São Paulo .....	0,164	0,980	9,220	13,184	2,400
Otocton .....	São Paulo .....	0,175	0,763	5,480	7,836	3,960
Palmetto .....	São Paulo .....	0,257	0,154	5,280	7,550	3,400
V-455 .....	São Paulo .....	0,342	1,170	2,640	3,775	4,340
V-484 .....	São Paulo .....	0,339	0,311	4,020	5,748	4,360
Farinha de soja crua	São Paulo .....	0,321	0,098	6,900	9,867	4,920

ÓLEO — A côr do óleo de soja varia do amarelo ao âmbar escuro, dependendo do método de extração (pressão ou solvente), e das variedades ou qualidades das sementes utilizadas.

O óleo é da classe dos semi-secativos, neutro ou praticamente destituído de ácidos livres; funde-se a 12°C, apresenta-se sob a forma de massa branca, untuosa, em temperatura inferior à do ponto de fusão; possui sabor oleaginoso, é isento de aroma, sendo um dos mais densos óleos vegetais conhecidos, com pêso específico que vai de 0,89 a 0,95.

Características do óleo — As propriedades do óleo de soja podem apresentar variações devidas ao número elevado de variedades cultivadas em solos e climas os mais diversos e ainda levando-se em conta o método de extração utilizado.

São as seguintes as constantes físico-químicas do óleo de soja, por cento, encontradas por DOLLEAR *et alii* (1940).

Pêso específico a 25/25°C .....	0,9195
Índice de refração a 25°C .....	1,4727
Índice de acidez .....	0,9
Índice de saponificação .....	193,5
Índice de iôdo .....	131,6
Insaponificável .....	0,84

Alguns autores dão, ainda, os seguintes índices:

Índice de Reichert-Meissl .....	0,2 — 0,7
Índice de Polenske .....	0,2 — 1
Título (°C) .....	22 — 27
Ponto de solidificação (°C) .....	15 a 8

Ácidos graxos — São os seguintes os dados coligidos por CIANCIO (1951), referentes aos ácidos graxos presentes em 100 g de óleo de soja; ácido palmítico 6,5; ácido linoléico 49,3; ácido oléico 32,0; ácido araquídico 0,7; ácido esteárico 4,2; ácido linolênico 2,2; ácido lignocérico 0,1.

É digno de nota, conforme afirma ARAUJO (1953), a riqueza desse óleo em ácidos graxos essenciais, como o oléico e linoléico.

PROTEÍNAS DA SOJA — Na composição das proteínas da soja, diz AMARAL (1958), “estão reunidos todos os aminoácidos essenciais, assim chamados porque, contribuindo para manter o equilíbrio nitrogenado do organismo, são indispensáveis ao exercício de todas as funções orgânicas e à conservação da vida. Tal circunstância confere à soja a situação de produto ideal para a correção das deficiências tão comuns nos diversos tipos de alimentos que consome o nosso povo”.

Duas proteínas se destacam na soja; a *glicinina* que é globulina, isolada e assim denominada por OSBORNE & CAMPBELL (1898), como a mais importante proteína da soja; a outra proteína é a *legumelina*, ligada ao grupo da albumina e encontrada, pelos referidos autores, em menor proporção e presente, também, nos diversos tipos de feijões.

Baseados em resultados de vários autores, passamos a enumerar os aminoácidos que integram a composição centesimal da *glicinina*:

AMINOÁCIDOS DA GLICININA			
<i>Essenciais</i>		<i>Não essenciais</i>	
Lisina .....	2,71 — 5,4	Ácido glutâmico .....	19,0 — 19,46
Arginina .....	5,12 — 8,3	Ácido aspártico .....	3,86 — 5,7
Valina .....	0,68 — 1,6	Prolina .....	3,78 — 4,3
Fenilalanina .....	3,83 — 4,3	Alanina .....	1,7
Leucina .....	8,45 — 9,2	Glicina .....	0,75
Triptofânio .....	1,7	Cistina .....	1,1 — 1,12
Treonina .....	2,1	Tirosina .....	1,86 — 3,9
Histidina .....	1,39 — 2,2	Serina .....	—
Metionina .....	1,8	Amônia .....	2,56
Isoleucina .....	2,4		
Glicocola .....	0,97		

AMARAL (1958) relaciona, como mais importantes, os aminoácidos citados a seguir, os quais estão presentes na molécula protéica da soja, nas seguintes porcentagens:

Isoleucina .....	3,4
Metionina .....	0,8
Valina .....	3,9
Fenilalanina .....	2,8
Leucina .....	5,0
Treonina .....	2,8
Lisina .....	7,9
Triptofânio .....	1,0
Arginina .....	14,2
Histidina .....	4,6

ROSE *et alii* (1951-1955), em recentes pesquisas bioquímicas, concluíram que a *arginina* e a *histidina*, apesar de importantes aminoácidos, não são essenciais ao equilíbrio nitrogenado do homem.

WU & FENTON (1953), analisando os aminoácidos da soja, observaram que os mesmos sofrem modificações não só durante o desenvolvimento das sementes como, também, por ocasião da extração, por meio de solventes ou por ação de cozimento, produzindo alterações no sabor e transformações que redundam no enriquecimento em determinadas vitaminas e passagem de aminoácidos *não essenciais* a outros que irão aumentar o teor dos *essenciais*.

Carboidratos — Os carboidratos da soja, conforme esclarece DAUBERT (1950), são de constituição bastante complexa, motivo porque, nos resultados analíticos, geralmente constam do extrato livre de nitrogênio, sem a devida especificação.

O total de carboidratos, presentes na soja, oscila entre 19 a 32% e estão constituídos por: sacarose, rafinose, pentosanas, galactanas, estaquiose, amido, açúcar invertido, dextrina, celulose, hemicelulose e outros açúcares.

O amido é encontrado em pequena quantidade em algumas variedades de soja, como verificaram alguns autores, na proporção de até 5,6%, enquanto outros pesquisadores não o revelaram, alegando que o amido está sempre presente nas sementes verdes ou imaturas da soja.

Heterósidos — JACOBS (1951), referindo-se à existência de heterósidos ou glicósidos na soja, cita resultados e observações de

WALZ, obtendo, de 10 quilos de farinha de soja, 1,5 g de *genistina*, componente êste cristalizável, com ponto de fusão oscilando de 254 a 256.º e que, por hidrólise, dá duas moléculas, uma de *glicose*, outra de *genisteína*. Parte do extrato original, insolúvel em acetona, produziu 3 glicósidos (saponinas).

Saponinas — O gôsto amargo existente nos grãos de soja tem, de há muito, motivado controvérsias e dado razões a estudos e intensivas investigações por parte de especialistas no assunto.

SUMIKI (1929) isolou saponina da soja com a fórmula  $C_{52}H_8O_{21}$ , a qual dá por hidrólise, respectivamente, sapogenina, glicose, ramnose, arabinose e, de modo provável, ácido orgânico (mesoxálico), sendo essa saponina considerada de pouca toxidez.

Recentemente ficou evidenciado, diz AMARAL (1958), que o amargo e o cheiro da soja estão associados a um derivado cetônico (metil-n-nonilcetona), que parece interagir com a pectina e o tanino dos grãos, produzindo o gôsto amargo.

Desta forma, não há mais razão para se acreditar, como aconteceu no passado, que o gôsto amargo da soja esteja ligado à saponina, à antocianina ou que haja qualquer relação entre ambas, pois a côr é devida a dois compostos flavônicos (2 - fenil - 1,4 - benzopirona e 2 - fenil-cremona).

Os recursos modernos da técnica industrial, baseados em estudos científicos, permitiram eliminar o cheiro e o sabor desagradáveis dos produtos da soja, para os tornarem uma substância alimentícia apreciada e largamente usada em todos os quadrantes do globo.

Isoflavonas — Está presente na soja uma isoflavona, glicósido denominado *genistina*. OKANO & BEPPU (1939-1940) isolaram quatro *isoflavonas* da soja: *tatoína*, *metilgenistina*, *metilisogenistina* e *isogenistina*.

Lecitina — Na preparação da lecitina, até há pouco tempo, utilizaram-se, como matérias primas, a gema do ôvo e o cérebro de animais; entretanto, estas substâncias cederam lugar à soja, por ser esta semente mais rica nesse princípio imediato e possibilitar técnica de extração muito prática e de rendimento mais vantajoso. As sojas produzidas e analisadas no Brasil deram, em média, 1,2% de lecitina no grão, e cerca de 2,0% na torta, provenientes da obtenção do óleo por expressão, segundo dados fornecidos por PAULA (1937). SCHULZE (1892) obteve da substância sêca da soja o teor de 1,64% de lecitina.

Extração da lecitina — São patenteados os processos de obtenção da lecitina e, entre êles, o que parece mais racional, segundo PAULA (1937), é o seguinte (Brevet D.R.P. n.º 602.637): “Os grãos de soja reduzidos a fragmentos (ou sua torta proveniente da obtenção de óleo por prensagem) são lavados, a frio, por uma mistura de 90 partes de benzeno e 10 partes de álcool. Concentra-se a mistura assim obtida, por evaporação; precipitam-se os fosfatídios dissolvidos por uma fraca corrente de vapor. O precipitado que se forma é constituído por emulsão de óleo, de fosfatídios, de água e de impurezas; centrifuga-se para se separar o máximo possível de óleo. À saída do centrifugador, a emulsão é constituída por mais ou menos 36% de lecitina vegetal, 24% de óleo e 40% de água. Mistura-se com um pêso igual de álcool a 96% à temperatura ambiente; deixa-se formar e depositar o precipitado sólido que se separa. O precipitado arrasta consigo, juntamente com o resto d’água, cêrca de 5% de lecitina e as impurezas.

A emulsão não contém, então, mais do que 10% de água.

Acaba-se o tratamento destilando a emulsão no vácuo, operação que retira o álcool e os últimos traços de água”.

No fim da operação obtém-se mistura de óleo e de lecitina, mais ou menos rica na última substância, que poderá ser empregada em margarinas, sabões, etc., ou purificada, ulteriormente, para fins farmacêuticos.

ENZIMAS — Na soja estão presentes as seguintes enzimas:

*urease*, que liberta amônia da uréia; não tem ação sôbre ácido úrico, guanidina, arginina, creatina e alantoína;

*uricase*, que decompõe o ácido úrico com formação de alantoína;

*lipoxidase*, observada na soja, em grande quantidade, por ANDRÉ & HOU (1932), que a reconheceram de alta especificidade e não dependente da *peroxidase*.

São encontradas ainda: *protease*, *caroteno-oxidase*, *coenzima* e *alantoína*. Esta última foi isolada das sementes de soja por FOSSE *et alii* (1930).

VITAMINAS — A soja é fonte de vitaminas, principalmente das do complexo B. Só a vitamina D, que é privilégio do reino animal, não está presente na soja. A vitamina A é consignada sob a forma de traços por alguns autores e, em maiores proporções, por outros, o mesmo sucedendo com a vitamina C.

ALMQUIST & STOKSTAD (1937) demonstraram haver apreciável quantidade de vitamina K no óleo de soja.

São os seguintes os valores vitamínicos encontrados, na soja, por pesquisadores dos Estados Unidos, Japão, Inglaterra e Alemanha, citados por Amaral:

#### VITAMINAS

A = 200 a 650 u. i.	C = 800 u. i.
B <sub>1</sub> = 175 a 485 u. i.	D <sub>2</sub> = 11 a 27 u. i.
B <sub>2</sub> = 300 a 600 gamas	E = 0,4 a 4,0 mg
B <sub>3</sub> = 4,8 mg	H (biotina) = 70 gamas
B <sub>4</sub> = 0,8 a 2,2 mg	K <sub>2</sub> = 0,2 a 0,5 mg
B <sub>6</sub> = 7,5 a 11,25 mg	

além de vitamina U e outras porventura menos estudadas.

USOS — A soja, pelo seu incontestável valor nutritivo e pelo elevado teor em reservas protéicas e minerais, vem sendo utilizada, há séculos, como alimento, principalmente do povo asiático.

Várias campanhas oficiais, de há muito, vêm sendo feitas, em nosso país, visando à expansão da cultura da soja, sua utilização como alimento indispensável à nossa gente, matéria prima destinada a fins industriais, alimentação do gado e fertilização do solo, sem, todavia, tais campanhas apresentarem resultados satisfatórios e imediatos.

Acreditamos dever-se a causa do desinterêsse de nossa gente pela soja ao fato de não ter, ainda, a nossa indústria de alimentos conseguido eliminar completamente, por métodos especiais, o gosto amargo e o cheiro desagradável, peculiares à rica leguminosa, porém temos a certeza de que, afastados êsses impasses, certamente, alcançará o lugar de destaque a que faz jus.

A semente da soja é considerada o alimento vegetal mais rico em proteínas. A sua farinha, possui, em pêso, de proteína, aproximadamente, duas vezes o da carne, 4 vezes o do ôvo, da farinha de trigo e de outros cereais; 5 a 6 vezes o do pão comum; 2 vezes o de outros feijões, nozes, amêndoas, etc., e 12 vezes o do leite.

SAMBAQUY (1957) indica uma série de receitas à base de soja, de grande valia para a orientação doméstica. Esclarece que "o emprêgo da soja tem sido, às vezes, limitado, não só por falta de conhecimento das condições que governam a sua utilização, como

também pela insistência na execução de determinadas preparações, que apresentam caracteres organolépticos que, positivamente, não são agradáveis". As referidas receitas foram recomendadas para a preparação dos seguintes pratos:

"Feijão "refogado", salada, pasta de soja para sanduíche, gelatina, doce de soja em pasta, bôlo de arroz e soja, bôlo de carne, de soja, empada, cocadinha de soja, bôlo de soja com especiarias, recheio de torta, cajuzinhos de soja, croquetes de camarão com soja, recheios para ameixas, pão de gengibre com soja, mingau de leite de soja, doce de leite de soja, arroz de leite de soja, manjar branco, licor de soja, siricaia, "biscuits" de farinha de soja, macarrão, pastel, "pizza" à napolitana, panqueca de soja, "waffles", panqueca de batata e soja, pão de soja com amendoim, bôlo de chocolate e soja, bôlo de laranja, sonhos, torta de limão, pão de fubá, biscoito de soja, sopa creme de tomate, mingau de farinha de soja "soufflé" de queijo e vários outros pratos preparados à base de brotos de soja.

A soja tem, também, aplicação nos regimes dietoterápicos.

É indicada nos regimes gástricos, duodenais, hepáticos, renais; em pediatria; nas doenças cardíacas; nas dispepsias, nas diarreias; nos estados febris; na alergia e na desnutrição.

O pão para diabéticos, preparado à base de farinha de soja, bem como biscoitos, mingaus, cremes, etc., empregados na alimentação destes enfermos, apresentam a vantagem de serem preparados com uma farinha na qual o amido geralmente não é encontrado, diminuindo, portanto, a porcentagem de carboidratos, quando adicionada ao trigo.

Os principais produtos da soja são: a semente, a farinha, o leite e o queijo.

**SEMENTE DE SOJA** — As sementes de soja, torradas, substituem as do amendoim.

**FARINHA DE SOJA** — Pelo valor biológico e realização do equilíbrio nitrogenado do organismo, a farinha de soja equipara-se à carne bovina e ultrapassa a farinha de trigo e a quase totalidade dos produtos alimentícios.

Vários processos de preparação da farinha de soja vêm sendo utilizados, através dos anos, todos eles tendo por princípio a prévia retirada do óleo e conseqüente pulverização da massa restante. Em linhas gerais, são os seguintes:

- a) aproveitamento do resíduo da obtenção do óleo, a frio, em simples prensas, usado pelos chineses;
- b) o de tratamento, sob alta pressão e calor elevado, em "expellers";
- c) o de extração do óleo por meio de solventes.

As farinhas de soja, preparadas a partir de tortas provenientes de prensas e "expellers", não são indicadas para alimentação humana, por apresentarem, ainda, gosto e cheiro desagradáveis e grande quantidade de celulose que as torna de difícil digestão, sendo, portanto, destinadas às rações de animais.

Sòmente a farinha produzida pelo processo de extração com solventes apresenta qualidades que a recomendam para a alimentação humana, devendo, todavia, a pasta ser submetida à própria prensagem.

Depois de experimentados vários solventes (hexana, isobutanol, di e tricloroetileno, tetracloreto de carbono, etanol, etc.), ficou comprovada a superioridade do etanol, álcool etílico ou álcool comum que retira o cheiro e o gosto da soja, atua sobre a molécula protéica, tornando-a mais digestível, pelo desdobramento e concentração em aminoácidos essenciais e exerce acentuada influência sobre a cor e a qualidade do óleo extraído. Para nós, o uso do álcool, como solvente, neste tratamento, é de grande vantagem por ser produto nosso, de baixo preço, e que não apresenta, como os demais solventes referidos, os problemas e dependências inerentes aos artigos importados.

**FARINHAS ALIMENTÍCIAS** — Nos países em que a questão alimentar tem constituído sério problema a ser resolvido, a adição, doseada racionalmente, de farinha de soja à farinha de trigo ou a outras substâncias alimentícias, evidenciou-se de tão grande valor que a soja passou a integrar os hábitos alimentares.

Em nosso país, onde a farinha de trigo mista é diminuída em valor nutritivo pela adição da raspa de mandioca, a substituição desta por igual porcentagem de boa farinha de soja, adviria em considerável benefício à população que, tradicionalmente, prês a ao uso de substâncias feculentas, na maior parte, se ressentia da falta de um alimento completo como a soja, incomparável na manutenção do equilíbrio orgânico.

No extremo Oriente, na Europa Central, na Inglaterra e nos Estados Unidos, é muito usado o pão misto de trigo e soja, prepa-

rado com farinhas especiais de soja, produzidas sob nomes registrados (*Berczeller* — Áustria e Hungria; *Soyolk* — Inglaterra; *Health* — Estados Unidos, etc.), com textura similar à da farinha de trigo comum.

De acôrdo com o fim a que se destina a farinha de trigo, quantidades diferentes (até 22%) de farinha de soja lhe são adicionados, visando não só ao aumento do valor nutritivo da preparação a ser feita, como, principalmente, no caso do pão branco e do pão prêto, a auxiliar a ação do fermento, a melhorar as qualidades de sabor, de corte e de conservação do produto, eliminando a secura e tendência a esfarelar.

Um produto de alto valor nutritivo e de grande repercussão nos Estados Unidos, e que está sendo últimamente introduzido em nosso país, é o "Multi-Purpose-Food". Esta preparação conhecida abreviadamente pelas iniciais "M.P.F.", idealizada na Califórnia pelo bioquímico Henry Borsook, é concentrado de soja que, em calorías e valor nutritivo, equivale, aproximadamente, a um bife, a uma batata cozida, a duas colheres (sopa) de ervilha e a um copo de leite.

**LEITE DE SOJA** — O leite de soja é usado na alimentação dos bebês, entre os orientais. O teor energético e vitamínico equipara-se ao do leite de vaca e ao do leite materno, sendo pouco inferior sòmente na porcentagem de glicídios.

Vários processos são indicados para a preparação do leite de soja, uns partindo de sementes inteiras, outros, de sementes moídas ou da farinha integral, e da torta proveniente da extração do óleo por meio de solventes.

SAMBAQUY apresenta o seguinte método de preparação do leite, a partir da farinha integral de soja: farinha de soja integral, 120 g; água, 1.500 ml; açúcar, 3 g; sal, 2 g.

Procedimento:

- a) aquecer os ingredientes assinalados em banho-maria durante 35 a 40 minutos; agitar bem o líquido durante esta operação;
- b) fazer filtração em pano fino;
- c) conservar o leite sob baixa temperatura.

A quantidade de leite alcançada neste procedimento é de, mais ou menos, um litro.

A composição média porcentual do leite de soja, segundo dados oferecidos por vários autores, é a seguinte:

água .....	80,0 — 92,0	glicídios .....	1,4, —, 2,4
protídios ....	3,4 — 4,0	cinza .....	0,45
lipídios .....	1,5 — 2,4	outros elementos .	1,45

**QUEIJO DE SOJA** — Há vários tipos de queijos de soja, elaborados a partir do leite de soja ou da coalhada de soja (esta última é preparada por fermentação ou por acidificação, preferentemente com vinagre).

Os queijos de soja (*tofú, natto, miso*) são muito apreciados pelos orientais.

A preparação do queijo é, na maior parte das vezes, feita pelo aquecimento, por alguns minutos, da coalhada de soja, cortando a massa formada, em várias direções, durante o aquecimento e, em seguida, fazendo escorrer o líquido, passando a massa para forma ou molde, procedendo ao salgamento, prensagem e conservação do queijo em lugar fresco, de preferência em geladeira.

São numerosos os produtos e subprodutos da soja empregados na alimentação humana e de animais, como, também, em diversos setores da indústria:

1. **PARA FINS ALIMENTARES E REGIMES DIETOTERÁPICOS** — A soja é empregada sob as seguintes formas: brotos; sementes verdes (tipo *petit-pois*), frescas e em conserva, secas; farinhas diversas; óleo para cozinha e saladas; leites fresco, condensado, e em pó; coalhada; queijo; mólho; pães diversos (5 a 22% de farinha de soja); pão para diabéticos; macarrão (até 20% de soja); margarina; pastelaria; biscoitos; chocolates; doces diversos; sucedâneos de ovos; preparações salgadas diversas e para fins farmacêuticos.

2. **PARA FINS INDUSTRIAIS** — Entre as inúmeras aplicações da soja nos vários setores da indústria, podemos citar as seguintes: como aglutinante; emulsificador (lecitina da soja); cimento à prova d'água; isolante para cabos elétricos; material plástico; lubrificante; preparado para apresto de tecidos; na fabricação de galalite, glicerina, oleados, linóleos, papel, celulóide, cola, esmaltes, tintas para pintura em geral (também de automóveis e de imprensa), vernizes, filmes fotográficos, peças para distribuição e instalação elétricas, sabonetes, sabões comuns, etc.

A lecitina da soja substitui, com vantagens, a lecitina do ovo nas preparações farmacêuticas.

3. PARA FINS AGROPECUÁRIOS — A introdução da soja nas propriedades agrícolas é de real vantagem, esclarece CALIL (1947), pelas razões seguintes:

*como planta leguminosa*, possui a faculdade de fixar o nitrogênio do ar atmosférico, enriquecendo dêsse importante elemento os terrenos em que é cultivada. Essa qualidade faz da soja preciosa planta para a rotação de outras culturas;

*como planta forrageira* pode ser empregada verde, fenada ou ensilada;

*como feno*, compara-se ao da alfafa e, *como silagem*, a soja consorciada ao milho, sorgo ou girassol proporciona alimento balanceado de grande valor nutritivo.

A soja em grãos é utilizada na engorda de eqüinos e de bovinos, porém as vacas leiteiras e os suínos a consomem moída, na proporção máxima de 1/3 dos concentrados. Esta precaução é tomada com o fim de equilibrar as rações ordinárias e de não produzir efeito laxativo nos animais.

A torta ou resíduo proveniente da extração do óleo pode ser utilizada como excelente adubo e na alimentação do gado.

## RESUMO

Neste trabalho o autor faz um estudo da soja, origem e cultura através dos tempos, principalmente na época atual, em que a produção de safras cada vez maiores desta privilegiada leguminosa vem despertando grande interêsse de quase tôdas as nações.

Refere-se ao início da cultura da soja no Brasil, bem como à sua introdução e aclimatação aos solos paulista, riograndense e paranaense.

Cita algumas das numerosas variedades, cultivadas em diversas regiões do globo e empregadas, não só na alimentação do homem e de animais, mas, ainda, na fertilização do solo.

A morfologia do fruto (legume) e das sementes mereceu do autor especial atenção. A questão da presença de amido em algumas variedades de soja não foi esquecida, em virtude da indiscutível importância dêsse glicídeo nos resultados de análises bromatológicas e em determinados regimes dietéticos. A estrutura microscópica da semente de soja foi tratada com o maior interêsse, por ser o seu conhecimento, nos mínimos detalhes, a parte fundamental do exame

microscópico, que possibilita o reconhecimento da histologia da verdadeira semente, bem como o de substâncias estranhas, acidental ou fraudulentamente introduzidas à farinha ou a outros produtos da soja.

Faz um estudo da composição química da semente, apresentando resultados de análises procedidas, por autores nacionais, em diversas variedades de soja cultivadas nos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Paraná e resultados analíticos de variedades produzidas nos Estados Unidos.

Especial referência é feita à composição do óleo, das proteínas, dos carboidratos, dos sais minerais, das vitaminas e dos demais componentes da soja.

O autor descreve o incontestável valor nutritivo e menciona extensa lista de aplicações da soja, não só na arte culinária, na dietética alimentar e de regimes, como também na indústria de produtos alimentícios, farmacêuticos, de arte, agropecuários e em indústrias diversas.

### SUMMARY

The author studies the origin and tillage of soybean, through the ages, chiefly at the present time, in which the production is increasing rapidly. The author considers the introduction of soybean in Brazil as well as its adaptation to the soils of the State of São Paulo, Rio Grande do Sul and Paraná. He refers to some varieties cultivated in various regions of the world as well as others cultivated among us, used not only as food for men and animals, but also as fertilizers.

The morphology, the microscopical structure of the seed, the presence of starch in some varieties, were thoroughly studied as well as the chemical composition of different varieties cultivated in São Paulo, Minas and Paraná.

### BIBLIOGRAFIA

ALMQUIST, H. J. & E. L. R. STOKSTAD — 1937 — Assay procedure for vitamin K (anti-hemorrhagic vitamin). *J. Nutrition* 14: 235-240.

AMARAL, A. — Soja e nutrição. São Paulo, Serv. Exp. Soja, Secret. Agric., 1958.

ANDRÉ, E. & K. HOU — 1932 — Sur la présence d'une oxydase des lipides ou lipoxydase dans la graine de soja, *Glycine soja* Lieb. *Compt. Rend. Acad. Sc.* 194: 645.

ANDRÉ, E. & K. HOU — 1932 — Sur les lipoxydases des graines de *Glycine soja* (Lieb) et de *Phaseolus vulgaris* (L.). *Compt. Rend. Acad. Sc.* 195: 172.

- ARAÚJO, J. — 1953 — Soja e a alimentação no lactente. *Rev. Hosp. Nossa Senhora Aparecida* 6: 293.
- BETHLEM, M. L. B. — 1953 — Teor de fósforo e cálcio em 50 variedades de feijões existentes no Brasil. *Rev. Quim. Pura Aplic. (Série 4)* 4 (3): 141-56.
- BETHLEM, M. L. B. — 1953 — Teor de ferro em 50 variedades de feijões existentes no Brasil. *Rev. Bras. Farm.* 34: (10): 385-98.
- CALIL, J. — 1947 — Plantemos soja! *Bol. Agric. (S. Paulo)* 48: 122-152.
- CIANCIO, P. N. — La soja y el problema alimentario del Paraguay. Assuncion, El Grafico, 1951.
- CHITWOOD, B. G. — 1949 — Root-knot nematodes. I. A revision of the genus *Meloidogyne* Goeldi, 1887. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 16: 90-104.
- DAUBERT, B. F. — Other constituents of soybean (*In* Markley, K. S. — Soybean and soybean products. New York, Interscience Publishers Inc., 1950. v. 1, p. 371-81).
- DOLLEAR, F. G., P. KRAUCZUNAS & K. S. MARKLEY — 1940 — The chemical composition of some soybean oils of high iodine number. *Oil and Soap* 17: 120-1.
- ECKEY, E. W. — Vegetable fats and oils. New York, Reinhold Publishers Corporation, 1954.
- FOSSE, R. *et alii* — 1930 — Présence dans de nombreux végétaux alimentaires de l'allantoïne, accompagnée ou non, d'acide allantoïque, d'allantoïnase et d'uricase. *Compt. Rend. Acad. Sc.* 191: 1153.
- HAGER, H. H. J. — Tratado de farmácia prática para farmacêuticos, droguistas, médicos y funcionarios de Sanidad. Barcelona, Editorial Labor S/A, 1942, v. 3.
- JACOBS, M. B. — The chemistry and technology of food and food products. 2nd. ed. New York, Interscience Publishers, 1951. v. 2, p. 1275.
- JAMIESON, G. S. — Vegetable fats and oils. 2nd. ed. New York, Reinhold Publishers Corporation, 1943, p. 300.
- JAMIESON, G. S. & H. S. MCKINNEY — 1935 — Phosphatides in American soybeans and oil. *Oil and Soap* 12 (4): 70-2.
- LOBBE, H. — Cultura da soja no Brasil. Rio de Janeiro, Minist. Agric. Dir. Estatística da Produção, 1935.
- MENEZES JUNIOR, J. B. F. — 1952 — Fraudes do café. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 12: 111-14.
- MIYASAKA, S. — 1954 — Melhoramento da soja. *Bragantia* 14: 9-17.
- MORSE, W. J. — History of soybean production. (*In* Markley, K. C. — Soybean and soybean products. New York, Interscience Publishers, 1950. v. 1, p. 3-59).
- OKANO, K. & I. BEPPU — 1939 — Coloring matters in soybean. I. Isolation of four kinds of isoflavone from soybean. *J. Agr. Chem. Soc. Japan* 15: 645-52. Resumo *in* *Chemical Abstracts* 34: 429.
- OSBORNE, T. B. & G. F. CAMPBELL — 1898 — Proteins of soybean (*Glycine hispida*). *J. Am. Chem. Soc.* 20: 419.
- PAULA, A. A. — 1958 — A cultura da soja e sua importância na alimentação. *Rev. Lavoura & Criação* 106: 41.
- PAULA, R. D. G. — A soja como matéria prima para a indústria. Rio de Janeiro, Inst. Nac. Tecnol., 1937.

RICKER, P. L. & W. J. MORSE — 1948 — The correct botanical name of the soybean. *J. Am. Soc. Agron.* 40: 190-1.

ROSE, W. M. C. *et alii* — 1951-1955 — The amino-acid requirements of man (Serial investigations). *J. Biol. Chem.* 182: 541; 188: 49; 193: 605, 613; 206: 421; 210: 331; 211: 815; 212: 201; 213: 913; 214: 579; 215: 101; 217: 987, 997.

SAMBAQUY, C. — Soja — carne vegetal. Rio de Janeiro "SAPS", 1957. 163 p.

SAMPAIO, S. C. — A soja. São Paulo, Dir. Publ. Agr., Secret. Agr. Ind. Com. 1940.

SILVA, J. G., L. G. E. LORDELLE & S. MIYASAKA — 1952 — Observações sobre a resistência de algumas variedades de soja ao nematóide das galhas. *Bragantia* (Campinas) 12: 59-64.

SUMIKI, Y. — 1929 — Study on the saponin of soy bean. I. *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan* 5: 27. (Resumo in *Chemical Abstracts*, 1930, 24: 3813).

WINTON, A. L. & K. B. WINTON — The structure and composition of foods. New York, John Wiley & Sons, 1932. v. 1, p. 513.

WU, C. HUAN & F. FENTON — 1953 — Effect of sprouting cooking of soybeans on palatability, lysine, triptophane, thiamine and ascorbic acid. *Food Research* 18 (6): 640.

# PRODUÇÃO DE "INTERFERON" E SUA AÇÃO NAS CULTURAS DE TECIDOS

MARTHA IRENA MALACHOWSKA \*

ADELA ROTH \*\*

LUÍS FLORÊNCIO DE SALLES GOMES \*\*\*

## *Introdução*

O fenômeno da interferência, já observado há anos, despertou, novamente, a atenção dos pesquisadores, com o trabalho de ISAACS & LINDENMANN (1957) sobre o "interferon". Segundo os autores, o "interferon" é uma substância protéica elaborada pelas células, quando previamente submetidas à ação do vírus da gripe, inativado pelo calor ou raios ultravioleta. Protegendo as células contra o ataque dos vírus, o "interferon", proteína de peso molecular semelhante ao da hemoglobina, impede o desenvolvimento do vírus que lhe deu origem ou de vírus heterólogos, possuindo, portanto, um largo espectro de ação.

Não se estabeleceu ainda o modo de ação do "interferon", mas presume-se que altere o metabolismo celular, não agindo diretamente sobre o vírus (BURKE & ISAACS, 1958). Uma das suas características originais é a de ser uma proteína do tipo universal, isto é, quando produzida em determinada espécie animal e, posteriormente, inoculada em outra, não produz o aparecimento de anticorpos.

---

\* Bolsista do Fundo de Pesquisas do Instituto Adolfo Lutz.

\*\* Biologista do I.A.L.

\*\*\* Médico-chefe do Laboratório de Vírus Dermotrópicos do Instituto Adolfo Lutz.

Trabalho realizado na Seção de Virulogia (Chefe de Seção: Dr. Luiz Augusto Ribeiro do Valle), da Diretoria de Microbiologia e Diagnóstico (Diretor: Dr. Luis de Salles Gomes) do I.A.L., em parte auxiliado pelo Fundo de Pesquisas do I.A.L.

Recebido para publicação em 20 de setembro de 1961.

Há divergência quanto à especificidade tecidual do "interferon" (HENLE *et alii*, 1959; TYRREL, 1959). Parece que, produzido em determinada espécie animal, protegeria mais efetivamente esta espécie. O trabalho de Isaacs abriu novo campo a pesquisas; fizeram-se experiências com vírus inativado (HENLE *et alii*, 1959), ou não (TYRRELL, 1959; SUTTON & TYRRELL, 1961), e com os de reduzida infectividade (HERRMANN, *et alii*, 1955), para o estudo e produção do "interferon".

Em revisão feita na literatura, não encontramos dados sobre a concentração do "interferon" usada nas experiências. Neste trabalho, apresentamos modificações à técnica de produção do "interferon", como obtê-lo em forma sólida, bem como estudos da sua ação sobre determinados vírus.

### MATERIAIS E MÉTODOS

As estirpes de vírus por nós selecionadas para a produção do "interferon" foram: A1/Denver/1/57 e A2/Japan/305/57 da gripe, e o vírus vacínico usado pelo Instituto Butantã para a vacinação antivariólica, que em nosso laboratório recebeu a denominação de "Bt".

Os vírus da gripe em fluido alantóico de ovos embrionados foram purificados por adsorção em hemácias de galinha e por diluição em solução fisiológica tamponada (pH = 7,2), a 37°C. Posteriormente, titularam-se estes vírus através de hemaglutinação pela técnica de Salk.

Obteve-se o vírus vacínico de macerado de membranas cório-alantóides, altamente infetadas com este vírus. O macerado foi suspenso em solução fisiológica tamponada, centrifugado a 2.500 r.p.m., 20', e o sobrenadante, posteriormente, ultracentrifugado a 10.000 r.p.m., 60'. O sedimento foi novamente suspenso em solução fisiológica tamponada (pH = 7,2) e titulado em membranas cório-alantóides pelo método de contagem de lesões ou placas.

Inativaram-se os vírus, em banho-maria a 56°C, durante 1 hora. Para cada 6,0 ml de suspensão de vírus, adicionaram-se 2,0 ml de citrato de sódio a 2% e 1,0 ml de tampão de borato pH = 8,5.

As culturas de tecido usadas foram as de rim de coelho, e as de embrião de galinha com 9 a 10 dias de incubação, feitas pelo método de tripsinização (YOUNGNER, 1954).

Os meios de cultivo usados foram o de Hanks com sôro de vitelo a 20%, e, para a manutenção das células, o mesmo meio com sôro de vitelo a 10%, adicionado de hidrolisado de lactalbumina a 2,5% e Yestolate a 0,3%.

Para a produção do "interferon" nas membranas cório-alantóides, usamos o meio de Earle e para as experiências com o "interferon", em culturas de tecido, usamos o meio 199 simplificado (ENDO & HAYASHIDA, 1960).

## PARTE EXPERIMENTAL

### *Produção do "interferon"*

Inicialmente seguimos o método descrito por Isaacs, preparando o "interferon" com amostras dos vírus da gripe, em culturas de rim de coelho (ISAACS & WESTWOOD, 1959) em meio 199 simplificado. Concentramos 10 vezes o "interferon" assim obtido, dialisando o meio com "carbowax 1.500". Este "interferon" concentrado demonstrou, em experiências preliminares, a propriedade de proteger as culturas de rim de coelho inoculadas com os vírus homólogos e também com o vírus vacínico.

Por estas experiências, foi-nos possível avaliar somente a concentração do "interferon" através do grau de proteção evidenciado pelo volume líquido usado. Acresce que o líquido dialisado e deixado a 4°C, mesmo após repetidas centrifugações, apresentava sempre depósito. E por idênticas falhas se repetirem também na preparação do "interferon" a partir de membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha, resolvemos modificar o método de sua obtenção.

Assim é que, para êsse fim, tomamos membranas cório-alantóides de ovos embrionados de galinha, com 9-10 dias de incubação, as quais, depois de excisadas, foram colocadas em garrafas de Roux, com meio de Earle. Nesse meio foram inoculados, separadamente, os vírus inativados da gripe (aproximadamente 2.560 DH por membrana) e o vírus vacínico (0,5 ml de uma suspensão a 20% em salina tamponada, pH = 7,2, também por membrana). Depois de passarem meio, vírus inativado e membranas por suave agitação durante 3 horas, a 37°C, foram as últimas lavadas 3 vezes em solução de Earle e a seguir postas em outra porção de meio de cultura, agora porém na proporção de 5 ml por membrana cório-alantóide. Nova agitação durante 24 horas, a 37°C, seguida de filtração do meio em 2 camadas de gaze estéril e de precipitação com sulfato de amônio, na proporção de 55,0 g por 100 ml do meio. Este precipi-

tado permaneceu em geladeira a 4°C até o dia seguinte, sendo depois centrifugado em centrífuga "Servall" refrigerada, a 6.000 r.p.m., durante 1 hora e, após perfeita dissolução em solução fisiológica tamponada, dialisado em sacos semipermeáveis, com água de torneira, durante 24 horas. O concentrado foi então novamente dialisado com água destilada, até o desaparecimento dos ânions  $SO_4$ . O líquido dialisado foi tratado (em câmara fria) com 10 volumes de acetona, sendo conservado em geladeira até o dia seguinte, a 4°C. Após nova centrifugação, o depósito foi levado à estufa a 37°C, para secagem. Desta maneira, obtivemos um pó de côr acastanhada, em quantidade aproximada de 20-30 mg por 10 membranas cório-alantóides usadas. Esse pó — substância protéica sêca, ou "interferon" — é solúvel em cêrca de 75% do seu pêso e o soluto com êle obtido, conservado em geladeira a 4°C, foi que serviu de base às nossas experiências. Desta maneira, foi possível a produção de "interferon" das amostras dos vírus da gripe (A1/Denver/1/57 e A2/Japan/305/57) e do vírus vacínico (amostra "Bt"). De posse dessas diversas amostras de "interferon", tratamos de pesquisar-lhes o comportamento em face da ação citopática, homóloga e heteróloga dos vírus utilizados na sua produção. Nestas experiências usamos culturas de embrião de galinha em meio 199 simplificado, ao qual, 24 horas antes da inoculação do vírus, era sempre adicionado o "interferon".

A tabela na página seguinte ilustra o estudo feito e apresenta os resultados obtidos quatro dias após a inoculação dos vírus.

Os resultados constantes da tabela demonstram que houve produção de "interferon" pelas células (membrana cório-alantóide), quando tratadas pelos vírus de gripe (A1/Denver/1/57 e A2/Japan/305/57), e vírus vacínico (amostra "Bt"). A propriedade do "interferon" de proteger as células, isto é, de diminuir ou inibir o efeito citopático dos vírus, foi evidente. Estas provas foram testemunhadas, de um lado, por uma substância também protéica, obtida pelo mesmo método, de membranas cório-alantóides normais, porém não submetidas prèviamente à ação dos vírus inativados, substância esta que foi incapaz de proteger as células inoculadas com vírus; e de outro lado, pela verificação de eventual ação tóxica do próprio "interferon" sôbre as células. As experiências, apresentadas na tabela, foram acompanhadas até o 7.º dia após a inoculação dos vírus, não se verificando qualquer alteração nos resultados. É óbvio que tôdas as fases do experimento foram também controladas com relação à esterilidade bacteriana.

TABELA

Nº TUB.	VIRUS ml			INTERFERONS ml @				CITOP.
	DENVER *	JAPAN †	BT X	DENVER	JAPAN	BT	CONTROL. MEMB.	
6	0,1	—	—	—	—	—	—	+++
6	—	0,1	—	—	—	—	—	++++
6	—	—	0,1	—	—	—	—	+++
6	0,1	—	—	0,1	—	—	—	+
6	0,1	—	—	—	0,1	—	—	0
6	0,1	—	—	—	—	0,1	—	+
6	0,1	—	—	—	—	—	0,1	+++
6	—	0,1	—	0,1	—	—	—	0
6	—	0,1	—	—	0,1	—	—	0
6	—	0,1	—	—	—	0,1	—	0
6	—	0,1	—	—	—	—	0,1	+++
6	—	—	0,1	0,1	—	—	—	+
6	—	—	0,1	—	0,1	—	—	+
6	—	—	0,1	—	—	0,1	—	±
6	—	—	0,1	—	—	—	0,1	+++

\* 64 DH / tubo

+ 64 DH / tubo

x  $1,2 \times 10^6$  / ml

@ 5 mg de substância seca dissolvida em 5 ml de meio 199 simplificado

(0,1 = 75 de interferon)

.. ++++ 100% de tecido destruido

+++ 75 % " " "

+ 25 % " " "

0 = ausência do efeito citopático

## COMENTÁRIOS

Existem referências sôbre a produção do "interferon" a partir de inúmeras amostras de vírus da gripe, como a "Melbourne", "Sendai" (Para-influenza), "Lee" e outras. De um modo geral, os autores referem que os Mixovírus são capazes de provocar a produção do "interferon". Isaacs indica a amostra "Melbourne" como boa provocadora, enquanto que outras amostras, como a "PR8" e "Lee" são más provocadoras. Em face dos resultados obtidos em nosso laboratório, podemos afirmar que as amostras de vírus por nós utilizadas apresentaram resultados satisfatórios. Em relação às amostras usadas, a A2/Japan/305/57 demonstrou maior susceptibilidade aos "interferons" produzidos; por outro lado, o "interferon" induzido por êste vírus foi o mais eficiente na proteção das células contra os vírus usados.

Outro fato interessante a ser destacado é que obtivemos "interferon" a partir do vírus vacínico (*Poxvirus officinale*).

O fato de não encontrarmos na literatura dados sôbre dosagem precisa do "interferon" levou-nos à tentativa de obtê-lo sob forma sólida (pó), através dos processos já descritos, tornando destarte possível a pesagem do produto, ainda que o mesmo não represente o "interferon puro", pois outras proteínas celulares podem, também, ser precipitadas pelo processo usado. Assim, utilizamos, neste trabalho preliminar, 75  $\gamma$  de "interferon" dissolvidos em meio 199 simplificado, com os resultados já descritos.

A reprecipitação, segundo princípios químicos, concorre para purificar ainda mais o produto obtido e a vantagem de obtê-lo sob forma sólida possibilita dissolvê-lo em quantidade ou volumes desejados.

Em prosseguimento a êstes estudos, estamos trabalhando na produção de maior quantidade de "interferon" para realizar uma série de experiências sôbre a especificidade, a ação em animais de laboratório, e também sôbre a estrutura química dessa substância.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Dr. Décio P. de Castro, encarregado do Lab. de Vírus Pneumotrópicos, pelo fornecimento das amostras dos Mixovírus, às técnicas D. Izelda Perissinotto, D. Yara D. Galluzzi e D. Eunice Gonçalves, do Lab. de Vírus Dermotrópicos e a D. Maria Nydia de Castro pela cooperação inestimável.

## RESUMO

Os autores descrevem detalhadamente a produção de "interferon" a partir de membranas cório-alantóides infetadas com as estirpes A1/Denver/1/57, A2/Japan/305/57 do vírus de influenza e com o vírus vacínico. Cada partida de "interferon" foi precipitada com sulfato de amônio e reprecipitada com acetona. O pó obtido foi dissolvido em meio de Earle de tal forma que 0,1 ml continha 75 gamas de "interferon". Em culturas de embrião de galinha, foi observada inibição do efeito citopático pelos vírus homólogos e heterólogos.

## SUMMARY

The production of "interferon" from chorioallantoic membranes infected with two influenza strains, A1/Denver/1/57, A2/Japan/305/57, and with vaccinia virus is described in detail. Each batch of "interferon" was precipitated with ammonium sulphate and reprecipitated with acetone. The dried precipitates were redissolved in Earle's solution so that 0.1 ml contained 75 gamma of powder. The materials were tested in chick embryo tissue cultures; in each case inhibition of the cytopathic effect produced by the homologous and the two heterologous viruses was observed.

## BIBLIOGRAFIA

BURKE, D. C. & A. ISAACS — 1958 — Further studies on interferon. *Brit. J. Exp. Path.* 39: 78-84.

BURKE, D. C. & A. ISAACS — 1958 — Some factors affecting the production of interferon. *Brit. J. Exp. Path.* 39: 452-458.

ENDO, M. & J. HAYASHIDA — 1960 — Sur le développement du virus poliomyélique dans un milieu simplifié du milieu synthétique n.º 199. *Japan J. Exp. Med.* 30: 89-93.

HENLE, W. *et alii* — 1959 — Studies on persistent infections of tissue cultures. *J. Exp. Med.* 110: 525-541.

HERMANN JUNIOR, E. C., O. F. ANDERSEN & A. HARKINS — 1955 — Tonic convulsions induced in mice by vaccinia virus and their prevention by heated influenza virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89: 536-543.

ISAACS, A., D. C. BURKE & L. FADEEVA — 1958 — Effect of interferon on the growth of viruses on the chick chorion. *Brit. J. Exp. Path.* 39: 447-451.

ISAACS, A. & J. LINDENMANN — 1957 — Virus interference. I. The interferon. *Proc. R. Soc. (Ser. B.)* 147: 258-267.

ISAACS, A., J. LINDENMANN & R. C. VALENTINE — 1957 — Virus interference. II. Some properties of interferon. *Proc. R. Soc. (Ser. B.)* 147: 268-273.

ISAACS, A. & M. A. WESTWOOD — 1959 — Inhibition by interferon of the growth of vaccinia virus in the rabbit skin. *Lancet* (7098): 324-5.

MALACHOWSKA, M. I. — The colicin producing strains of *E. coli* in children and their action on the strains of genus *Shigella* (Kolicynotwórcze szczepy *E. coli* u dzieci i ich działanie na szczepy rodzaju *Shigella*). Tese de doutoramento. Varsóvia, Inst. de Higiene, 1957.

SUTTON, R. N. P. & D. A. J. TYRRELL — 1961 — Some observations on interferon prepared in tissue cultures. *Brit. J. Exp. Path.* 42: 99-105.

TYRRELL, D. A. — 1959 — Interferon produced by cultures of calf kidney cells. *Nature* 184 (Suppl.): 452-453.

WAGNER, R. R. — 1960 — Viral interference. Some considerations of basic mechanisms and their potential relationship to host resistance. *Bact. Rev.* 24: 151-166.

YOUNGNER, J. S. — 1954 — Monolayer tissue cultures. I. Preparation and standardization of suspensions of trypsin-dispersed monkey kidney cells. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 85: 202-205.

## ESTUDO SÔBRE A COMPOSIÇÃO DE 12 ESPÉCIES DE PEIXES NACIONAIS — I

CLAYDES DE QUADROS ZAMBONI \*

Vários trabalhos têm sido realizados tendo como objeto a carne de pescado, levando em conta o seu valor nutritivo, comparável à carne bovina.

Por ser o tecido muscular de peixe utilizado como matéria alimentícia, a composição desse tecido é o que nos interessa. É constituído principalmente de água, proteína e quantidade variável de gordura.

Desde trabalhos de ATWATER (1888) e CLARCK e ALMY (1918) foi observado que o teor de protídios, no tecido muscular de peixes, é mais ou menos constante, oscilando ao redor de 20% e o resíduo mineral fixo é também aproximadamente constante, em torno de 1%. Há, entretanto, enorme variação na porcentagem de lipídios e umidade, influenciando nessa variação a espécie de peixe, a época, o local onde é pescado, a natureza da alimentação, o sexo e o grau de maturidade.

Muitas espécies de peixes armazenam gorduras como reserva; tais peixes migram, percorrendo longas distâncias e, durante essa migração, não se alimentam; mantêm-se, utilizando a gordura armazenada; isto causa uma variação estacional no teor de lipídios (STANSBY E LEMON - 1941).

O conteúdo de água em muitas espécies varia inversamente ao conteúdo de lipídios de modo que, na porção comestível, a soma do conteúdo de água e gordura é aproximadamente constante.

---

\* Química do Laboratório Regional de Santos — Inst. Adolfo Lutz.

Recebido para publicação em 30-10-61.

Uma vez que faltam trabalhos recentes, tendo como objeto as espécies nacionais, orientamos a nossa pesquisa com a finalidade de verificar a natureza da carne dos peixes mais comuns nos mercados de Santos, e por conseguinte, de São Paulo.

## PARTE EXPERIMENTAL

Os peixes foram fornecidos pelo Entrepasto de Pesca de Santos, juntamente com o nome da espécie, local e data da pesca. A medida que os recebíamos, cada peixe era medido (comprimento), pesado (pêso bruto), eviscerado e filetado; pesávamos os filés e calculávamos a porcentagem comestível. Consideramos parte comestível sòmente os filés, porque são os mais comumente aproveitados na alimentação. Nesta parte comestível foram realizadas as análises.

Os filés eram passados no liquidificador (com moedor de carne) e guardados em vidros fechados com tampa esmerilhada.

## MÉTODOS

Baseamo-nos nos Métodos de Análises Bromatológicas do Instituto Adolfo Lutz, com algumas modificações.

1.º — *Determinação da água* — Fizemos uma tomada de 5 g a 10 g; trituramos com areia e determinamos a perda de pêso, após deixar em estufa a 101 °C por 4 horas.

2.º — *Determinação do resíduo mineral fixo* — Depois de determinada a umidade, deixamos a cápsula em mufla a 550 °C por mais ou menos 6 horas, até a obtenção de cinzas brancas e pêso constante.

3.º — *Determinação dos lipídios* — Procedemos a uma tomada de mais ou menos 8 g, trituramos com areia, transferimos para um cartucho de extração de Soxhlet, extraímos durante cêrca de 12 horas com éter e secamos em estufa a 100 °C por 2 horas.

4.º — *Determinação dos protídios* — Os protídios (proteína bruta) foram determinados por diferença. A proteína varia muito

pouco e, tendo sido os outros três dados obtidos com cuidado, pudemos ter por diferença a proteína, sem larga margem de erro (ATWATER - 1888).

5.º — *Determinação das calorías por 100 g* — Por meio de cálculo (9,3 X % de lipídios + 4,1 X % de protídios), obtivemos as calorías por 100 g.

## RESULTADOS

Encontramos dificuldade na amostragem, embora tivéssemos uma quantidade razoável de peixes. As amostras eram heterogêneas, havendo grande variação no tamanho das mesmas; houve também falta de fornecimento de algumas espécies, em certas épocas do ano, de modo que, nestes casos, não pudemos levar em consideração o resultado.

Analisamos as seguintes espécies:

Bagre (*Bagre marinus* — fam. *Ariidae*)

Caçonete (*Euselachii picuro trematal*)

Carapeva (*diapterus rhombeus* — fam. *Garridae*)

Corvina (*Micropogon furnieri* — fam. *Sciaenidae*)

Galo (*Selene vomer* — fam. *Carangidae*)

Goete (*Archoscion petranus* — fam. *Sciaenidae*)

Oveva (*Larimus braviceps* — fam. *Sciaenidae*)

Paru (*Pomocanthus archoatus* — fam. *Chaetodontidae*)

Pescada Branca (*Cynoscion sp.* — fam. *Sciaenidae*)

Pescada perna de mōça (*Cynoscion sp.* — fam. *Sciaenidae*)

Raia Viola (*Rhinobatus percellens* — fam. *Rhinobatidae*)

Roncador (*Conodon nobilis* — fam. *Haemulidae*).

As pesquisas foram efetuadas de maio de 1960 a junho de 1961.

Nos quadros seguintes, damos a relação dos peixes analisados e os resultados obtidos:

# QUADRO I

## B A G R E

N.º de amostras — 18

Porcentagem comestível (média) — 47,34%

Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lipídios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
291	31	77,60	1,87	0,40	20,13	86,3	23-4	Monte do Trigo (SP)
184	30	76,13	1,58	1,44	20,85	99,4	23-4	Monte do Trigo (SP)
577	40	78,74	1,27	1,86	18,13	91,6	3-5	Barra do Icapara (SP)
169	33	76,77	1,83	0,81	20,59	91,9	25-5	Barra do Icapara (SP)
292	32	76,89	1,18	3,90 *	18,03	110,2	2-6	S. Francisco do Sul (SC)
455	35	75,10	1,31	4,20	19,39	118,3	10-9	I. Queimada Pequena (SP)
310	35	75,71	1,63	0,99	20,67	94,0	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
029	41	72,50	1,30	7,63 *	18,57	147,2	18-9	Rio Grande do Sul (RS)
362	34	76,08	1,74	1,92	20,26	100,9	25-9	I. Bom Abrigo (SP)
385	33	79,30	1,21	1,14	18,35	85,8	14-10	I. Bom Abrigo (SP)
695	40	77,26	1,36	0,66	20,72	91,1	21-10	I. Bom Abrigo (SP)
260	31	79,44	1,20	1,21	18,15	85,7	29-11	I. Bom Abrigo (SP)
660	39	77,88	1,07	0,82	20,23	90,5	12-12	I. Bom Abrigo (SP)
495	40	77,52	1,22	2,57 *	18,69	100,5	15-12	Itajaí (SC)
630	41	77,35	1,29	1,72 *	19,64	96,5	29-12	S. Francisco do Sul (SC)
615	42	79,09	1,25	1,03	18,63	86,0	7-1	I. Bom Abrigo (SP)
490	38	75,76	1,16	4,16 *	18,92	116,3	4-2	Itajaí (SC)
330	33	78,94	1,29	1,65	18,12	89,7	8-3	I. Queimada Grande (SP)
Máximo	695	42	79,44	1,87	7,63	20,85		
Mínimo	169	30	72,50	1,07	0,40	18,03		
Média ..	418,27	36	77,11	1,37	2,11	19,33		

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## QUADRO II

### CAÇONETE

N.º de amostras — 12

Porcentagem comestível (média) — 66,40%

Pêso	Comprimento	Umidade	Cinzas	Lipídios	Protídios	Calorias	Data da pesca	Local da pesca
g	cm	%	%	%	%	por 100 g	1960-1961	
1264	65,5	74,96	1,65	0,54	22,85	98,6	3-5	Barra do Icapara (SP)
335	45,0	76,09	1,32	0,30	22,29	94,2	30-5	I. Bom Abrigo (SP)
437	47,0	75,51	1,46	0,61	22,42	97,6	2-6	I. Bom Abrigo (SP)
244	40,0	75,67	1,59	0,73	22,01	97,0	3-7	Ararapira (SP)
342	42,0	75,97	1,45	0,93	21,65	97,4	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
385	40,0	76,23	1,08	0,10	22,59	93,6	27-10	I. Bom Abrigo (SP)
250	40,0	76,39	1,08	0,62	21,91	95,6	29-11	I. Bom Abrigo (SP)
467	47,0	75,43	1,26	0,28	23,03	97,1	13-12	I. Bom Abrigo (SP)
340	41,0	74,53	1,34	0,31	23,82	100,3	28-12	Guaraú (SP)
367	45,0	74,92	1,08	0,30	23,70	100,3	7-1	I. Bom Abrigo (SP)
405	44,0	75,85	1,41	0,81	21,93	98,5	2-5	Jurêia (SP)
220	37,0	76,22	1,43	0,86	21,49	96,1	29-5	I. Bom Abrigo (SP)
Máximo .	1264	65,5	76,39	1,65	0,93	23,82		
Mínimo .	220	37,0	74,53	1,08	0,10	21,49		
Média ...	421	44,4	73,98	1,34	0,53	22,47		

OBSERVAÇÃO — O cação era-nos fornecido eviscerado e sem cabeça; daí, sua porcentagem comestível ser maior, em relação aos outros peixes. O comprimento não foi real, por faltar a cabeça.

### QUADRO III

#### CARAPEVA

N.º de amostras — 9

Porcentagem comestível (média) — 42,94%

Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lipídios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
132	20	72,72	1,37	7,37	18,54	144,5	20-6	Sombrio (I. São Sebastião — SP)
268	21	77,56	1,35	1,49	19,60	94,2	3-7	Ararapira (perto de Bom Abrigo — SP)
347	30	76,64	1,26	1,06	21,04	96,1	7-8	I. Bom Abrigo (SP)
390	26	75,12	1,40	3,20	20,28	113,0	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
165	21	79,27	1,00	0,45	19,28	83,2	12-11	I. Bom Abrigo (SP)
190	25	79,20	1,00	1,06	18,74	86,7	29-11	I. Bom Abrigo (SP)
135	25	76,75	1,22	1,20	20,83	100,6	10-3	I. Bom Abrigo (SP)
312	25	76,83	1,57	1,57 *	20,03	96,7	9-4	Guaraú (SP)
100	21	78,44	1,53	1,10 *	18,93	87,8	22-4	Guaraú (SP)
Máximo	390	30	72,72	1,57	7,37	21,04		
Mínimo	100	20	79,27	1,00	0,45	18,54		
Média ..	215	23	76,94	1,30	2,05	19,69		

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

# QUADRO IV

## CORVINA

N.º de amostras — 26

Porcentagem comestível (média) — 42,60%

Pêso	Compri- mento	Umidade	Cinzas	Lipídios	Protídios	Calorias por 100 g	Data da pesca	Local da pesca
g	cm	%	%	%	%		1960-1961	
578	37,5	80,15	1,51	0,31	18,03	76,8	27-4	Enseada de Santos (SP)
379	34,0	79,79	1,20	0,54	18,47	80,7	2-6	I. Bom Abrigo (SP)
164	25,0	76,50	1,48	2,48	19,54	103,2	5-6	Joatinga (perto do Rio de Janeiro — SP)
245	27,0	77,37	1,91	1,16 *	19,56	91,0	27-6	São Francisco do Sul (SC)
845	45,0	80,85	1,23	0,26	17,66	74,8	11-7	Parati (RJ)
493	35,0	78,93	1,60	2,44	17,03	92,5	7-8	Bom Abrigo (SP)
588	39,0	80,13	1,20	0,33	18,34	73,3	21-8	São Francisco do Sul (SC)
355	30,0	78,29	1,27	1,10	19,34	89,5	15-9	Lage da Conceição (SP)
630	35,0	78,00	1,62	1,62	18,76	92,0	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
605	39,0	80,84	1,15	0,25	17,76	75,1	8-10	I. Bom Abrigo (SP)
435	35,0	81,25	1,50	0,12	17,13	71,4	19-10	I. Bom Abrigo (SP)
580	37,0	79,72	1,91	0,51	17,86	78,0	21-10	I. Bom Abrigo (SP)
545	30,0	78,43	1,91	0,10	19,56	81,1	27-10	I. Bom Abrigo (SP)
497	35,0	81,68	1,07	0,12	17,13	71,4	5-11	I. Bom Abrigo (SP)
390	33,0	78,97	1,27	0,42	19,34	83,2	12-11	I. Bom Abrigo (SP)
566	40,0	79,41	1,17	0,96 *	18,46	84,6	27-11	Costa do Uruguai (Rep. Uruguai)
435	35,0	80,31	1,10	0,33 *	18,26	77,9	15-12	Itajaí (SC)
820	43,0	78,51	1,06	0,19 *	20,24	84,7	15-12	São Francisco do Sul (SC)
330	35,0	78,18	1,59	0,81	19,42	87,2	7-1	Bom Abrigo (SP)
540	35,0	79,88	1,00	1,51 *	17,61	86,2	4-2	Itajaí (SC)
325	33,0	80,00	1,00	0,33	18,67	79,6	23-2	I. Bom Abrigo (SP)
130	23,0	78,29	1,02	0,45	20,24	87,2	6-3	I. Queimada Grande (SP)
200	24,0	78,91	1,25	0,90	18,94	86,0	6-3	I. São Sebastião (SP)
200	26,0	79,73	1,55	1,54	17,18	84,8	10-5	Juréia (SP)
400	35,0	77,12	1,20	1,24 *	20,44	95,3	15-5	Rio Grande (RG)
375	31,0	78,67	1,12	0,78	19,43	86,9	2-6	Juréia (SP)
Máximo	845	45,0	81,68	1,91	2,48	20,44		
Mínimo	130	24,0	76,50	1,00	0,10	17,03		
Média ...	447	34,0	79,23	1,34	0,80	19,20		

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## QUADRO V

## G A L O

N.º de amostras — 15

Porcentagem comestível (média) — 42,97%

Pêso	Comprimento	Umidade	Cinzas	Lipídios	Protídios	Calorias	Data da pesca	Local da pesca
g	cm	%	%	%	%	por 100 g	1960-1961	
311	30,0	79,55	1,24	0,30	18,91	80,3	2-5	I. Bom Abrigo e Juréia (SP)
337	30,0	78,38	1,30	0,28	20,04	84,8	15-5	I. Bom Abrigo (SP)
141	23,0	76,04	1,25	2,12	20,59	103,1	20-6	Sombrio (I. S. Sebastião — SP)
460	23,0	77,97	1,20	0,74	20,09	89,2	21-8	São Francisco do Sul (SC)
490	30,0	77,77	1,41	2,01	18,81	95,8	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
373	32,0	77,97	1,10	0,34	20,59	84,4	8-10	I. Bom Abrigo (SP)
680	40,0	77,93	1,00	0,47	20,60	87,8	21-10	I. Bom Abrigo (SP)
345	32,0	77,58	1,54	0,80	20,08	89,8	12-11	I. Bom Abrigo (SP)
510	26,0	77,35	1,00	0,92	20,73	93,6	2-12	I. Bom Abrigo (SP)
250	30,0	77,45	1,38	0,51 *	20,66	89,5	15-12	Itajaí (SC)
615	35,0	77,77	1,31	0,37 *	20,55	87,7	28-12	Guaraú (SC)
200	25,0	77,17	1,88	0,28	20,67	87,3	21-1	Monte do Trigo (SP)
260	24,0	77,65	1,66	0,62 *	20,07	88,1	4-2	Itajaí (SC)
90	20,0	77,42	1,41	1,23 *	19,94	93,3	14-4	Guaraú (SC)
280	30,0	77,22	1,91	0,86	20,01	90,0	10-5	Juréia (SP)
Máximo .	690	40,0	79,55	1,91	2,12	20,73	103,1	
Mínimo .	90	20,0	76,04	1,00	0,28	18,81	80,3	
Média ...	362,80	28,6	77,68	1,37	0,79	20,15	89,6	

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

# QUADRO VI

G O E T E

N.º de amostras — 18

Porcentagem comestível (média) — 52,59%

Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lipídios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
158	23	77,03	1,76	0,47	20,74	89,4	29-4	Ilhas Queimadas (SP)
130	26	78,29	1,22	0,34	20,15	85,8	25-5	I. Bom Abrigo (SP)
178	23	77,43	1,42	1,60	19,55	95,0	2-6	I. Bom Abrigo (SP)
310	26	80,07	1,19	1,15	17,59	82,8	7-8	I. Bom Abrigo (SP)
260	25	76,00	1,62	1,94	20,44	101,8	14-9	Lage da Conceição (SP)
374	33	77,68	1,02	3,75 *	17,81	107,9	18-9	Rio Grande do Sul (RS)
285	30	72,36	1,23	6,10	20,31	140,0	25-9	I. Bom Abrigo (SP)
330	30	79,00	1,41	0,24	19,35	81,6	8-10	I. Bom Abrigo (SP)
277	28	77,83	1,26	0,31	20,60	87,3	5-11	I. Bom Abrigo (SP)
225	26	79,76	1,14	1,04	18,06	83,7	12-12	I. Bom Abrigo (SP)
245	27	77,17	1,46	0,70	20,67	91,3	16-12	I. Bom Abrigo (SP)
200	26	80,52	1,12	0,42 *	17,94	77,5	28-12	Guaraú (SC)
202	27	77,03	1,29	0,88 *	20,80	94,5	29-12	S. Francisco do Sul (SC)
210	22	80,85	1,17	0,51	17,47	76,4	23-2	I. Bom Abrigo (SP)
170	24	79,45	1,02	0,32	19,21	81,7	6-3	Ilha Queimada Grande (SP)
80	22	79,42	1,22	1,66	17,70	88,0	6-3	I. São Sebastião (SP)
190	22	79,34	1,28	0,53	18,85	82,2	2-6	Juréia (SP)
190	28	80,63	1,04	1,09	17,24	80,8	14-6	I. Bom Abrigo (SP)
Máximo	374	33	80,85	1,76	6,10	20,80	140,0	
Mínimo	80	22	72,36	1,02	0,24	17,24	76,4	
Média ..	223	26	78,32	1,27	1,26	19,19	89,8	

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## QUADRO VII

O V E V A

N.º de amostras — 10

Porcentagem comestível (média) — 47,68%

Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lípidios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
137	21,0	75,71	1,67	1,99	20,63	103,1	22-6	Sombrio (I. S. Sebastião — SP)
110	21,0	78,81	1,39	0,68	19,12	84,7	3-7	Ararapira (perto de B. Abrigo — SP)
115	22,0	75,60	1,77	2,49	20,14	105,7	11-7	Paratí (RJ)
174	23,0	75,21	1,91	2,11	20,77	104,8	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
300	27,0	77,61	1,04	0,53 *	20,82	90,3	30-10	Guaraú (SC)
197	28,0	79,88	1,00	0,32 *	18,80	80,1	29-12	S. Francisco do Sul (SC)
285	27,0	79,04	1,00	0,77 *	19,19	85,9	13-1	S. Francisco do Sul (SC)
210	25,0	78,97	1,22	0,57 *	19,24	84,2	4-2	Itajaí (SC)
165	24,0	79,74	1,35	0,71 *	18,20	81,2	6-4	Guaraú (SC)
110	18,0	78,63	1,37	1,99 *	18,01	92,3	22-4	Guaraú (SC)
Máximo	300	28,0	79,88	1,77	2,49	20,82		
Mínimo .	110	18,0	75,21	1,00	0,32	18,01		
Média ...	180	23,6	77,92	1,37	1,22	19,49		

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## QUADRO VIII

P A R U

N.º de amostras — 8

Porcentagem comestível (média) — 38,02%

Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lipídios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
503	25	75,06	1,38	0,76	22,80	100,5	3-5	Barra Icapara (SP)
161	16	75,56	1,41	0,37	22,66	96,4	17-5	I. Bom Abrigo (SP)
600	25	75,69	1,00	1,36	21,95	102,6	25-8	I. Bom Abrigo (SP)
249	19	75,27	1,29	3,16 *	20,28	112,6	17-11	Itajaí (SC)
355	25	78,34	1,22	0,68	19,76	87,3	22-2	I. Bom Abrigo (SP)
500	26	80,17	1,05	0,39 *	18,39	79,0	4-2	Itajaí (SC)
205	18	75,30	1,36	0,46	22,88	98,0	17-3	Iguape (SP)
355	22	78,05	1,41	0,45	20,09	86,5	27-4	I. Bom Abrigo (SP)
Máximo .	600	26	80,17	1,41	3,16	22,88	112,6	
Mínimo .	161	16	75,06	1,00	0,37	18,39	79,0	
Médio ...	366	22	76,68	1,27	0,95	21,10	95,3	

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## QUADRO IX

### PESCADA BRANCA

N.º de amostras — 18

Porcentagem comestível (média) — 54,80%

Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lípidios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
610	36,0	73,99	1,18	6,15 *	18,63	103,7	8-6	Itajaí (SC)
300	30,0	80,01	1,14	0,54	13,31	80,1	19-8	I. Bom Abrigo (SP)
470	35,0	72,61	1,08	5,88	20,43	138,4	15-9	Lage da Conceição (SP)
790	43,0	78,49	1,11	0,31 *	20,09	85,2	18-9	Rio Grande do Sul (RS)
332	32,0	77,92	1,00	2,92	18,16	101,6	8-10	I. Bom Abrigo (SP)
352	34,0	79,84	1,01	1,24	17,91	85,0	14-10	I. Bom Abrigo (SP)
232	29,0	80,76	1,00	0,34	17,90	76,5	5-11	I. Bom Abrigo (SP)
264	30,0	77,41	1,00	1,72	19,87	97,5	12-11	I. Bom Abrigo (SP)
290	31,0	78,32	1,41	0,68	19,59	80,6	12-12	I. Bom Abrigo (SP)
340	34,0	80,20	1,10	0,63 *	18,07	79,9	28-12	Guaraú (SC)
150	26,0	80,52	1,00	0,53	17,95	78,5	7-1	I. Bom Abrigo (SP)
350	35,0	79,42	1,05	1,58 *	17,95	88,3	13-1	S. Francisco do Sul (SC)
180	26,0	79,35	1,00	1,78	17,87	91,8	21-1	Monte Trigo (SP)
145	26,0	78,99	1,19	0,72	19,10	85,0	17-3	Iguape e Bom Abrigo (SP)
177	26,0	78,77	1,03	0,57	19,63	85,8	17-3	I. Bom Abrigo (SP)
120	21,0	77,48	1,41	1,00	20,11	91,7	6-3	I. S. Sebastião (SP)
197	26,0	79,98	1,12	1,68 *	17,22	86,2	9-4	Guaraú (SC)
210	28,0	76,88	1,20	4,53	17,39	113,3	29-6	I. Bom Abrigo (SP)
Máximo	790	43,0	80,76	1,41	6,15	20,43	138,4	
Mínimo	120	21,0	72,61	1,00	0,31	17,22	76,5	
Média ...	306	30,5	78,38	1,11	1,82	18,67	97,1	

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

**QUADRO X**  
**PESCADA PERNA DE MOÇA**

N.º de amostras — 19

Porcentagem comestível (média) — 49,59%

Pêso	Comprimento	Umidade	Cinzas	Lípidios	Protídios	Calorias por 100 g	Data da pesca	Local da pesca
g	cm	%	%	%	%		1960-1961	
375	32,0	77,13	1,08	3,98 *	17,81	110,0	3-6	S. Francisco do Sul (SC)
137	21,0	77,05	1,78	3,25	17,92	103,7	20-6	Sombrio (I. S. Sebastião — SP)
198	30,0	80,16	1,37	1,37	17,10	82,8	3-7	Ararapira (perto de Bom Abrigo — SP)
556	37,0	78,15	1,10	0,35	20,40	86,9	7-8	I. Bom Abrigo (SP)
235	28,0	78,56	1,06	0,35 *	20,03	85,4	21-8	S. Francisco do Sul (SC)
305	28,0	78,11	1,32	2,87	17,70	99,3	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
382	31,0	77,96	1,00	2,69	18,35	100,3	25-9	I. Bom Abrigo (SP)
526	35,0	78,62	1,05	0,22	20,11	84,5	14-10	I. Bom Abrigo (SP)
255	26,0	77,95	1,37	0,25	20,43	86,0	27-10	I. Bom Abrigo (SP)
220	27,0	80,33	1,21	0,45	18,01	78,0	29-11	I. Bom Abrigo (SP)
340	31,0	80,02	1,06	0,40 *	18,52	79,6	15-12	Itajaí (SC)
290	28,0	79,38	1,05	0,86 *	18,71	84,7	4-2	Itajaí (SC)
120	22,0	78,92	1,12	1,00	18,96	87,0	6-3	I. Queimada Grande (SP)
120	22,0	79,82	1,03	0,80	18,35	82,7	6-3	I. Queimada Grande (SP)
135	24,0	79,09	1,43	1,03 *	18,45	85,2	9-4	Guaraú (SC)
150	24,0	79,78	1,52	0,83	17,87	81,0	22-4	I. Bom Abrigo (SP)
220	27,0	79,44	1,00	0,79	18,77	84,3	27-4	I. Bom Abrigo (SP)
190	25,0	79,76	1,33	0,82	18,09	81,8	10-5	Juréia (SP)
170	25,0	79,96	1,32	0,13	18,59	77,4	14-6	I. Bom Abrigo (SP)
Máximo	556	37,0	80,33	1,78	3,98	20,43		
Mínimo	120	21,0	77,05	1,00	0,13	17,10		
Média ...	264	27,5	78,96	1,22	1,18	18,69		

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## QUADRO XI

### RAIA VIOLA

N.º de amostras — 8

Porcentagem comestível (média) — 45,51%

	Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lipídios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
	1044	69,0	72,10	1,24	0,71	25,95	113,0	3-5	Barra do Icapara (Iguape — SP)
	460	46,0	73,45	1,48	0,29 *	24,78	104,3	2-6	S. Francisco do Sul (SC)
	1870	41,0	74,56	1,36	0,58	23,50	101,7	20-6	Sombrio (I. S. Sebastião — SP)
	1757	81,0	73,31	1,25	0,22	25,22	105,5	21-7	I. Bom Abrigo (SP)
	515	53,0	74,31	1,09	0,31	24,29	102,5	15-8	I. Bom Abrigo (SP)
	610	56,0	71,99	1,06	0,41	26,54	112,6	21-10	I. Bom Abrigo (SP)
	377	48,0	75,07	1,34	0,18	23,41	97,6	5-11	I. Bom Abrigo (SP)
	292	44,0	75,32	1,07	0,20	23,41	97,8	4-5	I. Bom Abrigo (SP)
Máximo .	1870	81,0	75,32	1,48	0,71	26,54	113,0		
Mínimo .	292	41,0	72,10	1,06	0,18	23,41	97,6		
Média ...	865	54,7	73,76	1,23	0,36	24,63	104,3		

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## QUADRO XII

### RONCADOR

N.º de amostras — 16

Porcentagem comestível (média) — 41,52%

Pêso g	Comprimento cm	Umidade %	Cinzas %	Lípidios %	Protídios %	Calorias por 100 g	Data da pesca 1960-1961	Local da pesca
566	33,0	77,08	1,27	0,26	21,39	90,1	23-4	Monte Trigo (SP)
225	25,0	76,40	1,58	1,34	20,68	97,2	3-6	I. Bom Abrigo (SP)
494	34,0	73,67	1,85	3,42	21,06	118,1	5-6	Joatinga (perto R. Janeiro — SP)
340	29,0	77,25	1,64	0,47 *	20,64	89,0	27-6	S. Francisco do Sul (SC)
433	30,0	79,07	1,33	0,77	18,83	84,4	21-7	I. Bom Abrigo (SP)
470	25,0	79,90	1,23	0,64 *	18,23	80,7	21-8	S. Francisco do Sul (SC)
390	28,0	75,19	1,62	1,60	21,59	103,4	10-9	I. Queimada Pequena (SP)
230	24,0	75,12	1,75	2,54	20,59	91,6	15-9	I. Bom Abrigo (SP)
332	27,0	78,21	1,19	0,70	19,90	88,1	14-10	I. Bom Abrigo (SP)
335	30,0	78,33	1,18	0,17	20,32	84,9	27-10	I. Bom Abrigo (SP)
325	27,0	77,58	1,40	0,30	20,72	87,7	9-11	I. Bom Abrigo (SP)
300	28,0	77,80	1,34	0,70	20,16	89,2	30-11	I. Bom Abrigo (SP)
430	31,0	78,38	1,00	0,31 *	20,31	86,1	28-12	Guaraú (SP)
240	29,0	77,94	1,43	1,67	18,96	93,3	23-2	I. Bom Abrigo (SP)
145	22,0	79,77	1,00	1,19	18,04	85,0	6-3	I. S. Sebastião (SP)
187	23,0	79,29	1,12	1,43 *	18,16	87,7	9-4	Guaraú (SC)
Máximo .	566	34,0	79,90	1,85	3,42	21,59	118,1	
Mínimo .	145	22,0	73,67	1,00	0,17	18,04	80,7	
Média ...	340	27,8	77,56	1,37	1,09	19,97	91,0	

\* Vide p. 16, § 2.º - a.

## DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Apresentamos êste estudo como uma nota prévia, por termos poucos dados para chegar a uma conclusão definitiva.

Verificamos que:

1.º — O teor de protídio e resíduo mineral fixo é mais ou menos constante.

2.º — Há certamente uma grande variação no teor de umidade e de lipídios\*:

- a) talvez haja influência do local da pesca (observem-se nos quadros os resultados marcados com asteriscos); algumas espécies provenientes do Rio Grande do Sul e Santa Catarina apresentam porcentagem de lipídios elevada em relação às provenientes dos arredores de Santos.
- b) parece haver tendência para valores maiores de lipídios no inverno.
- c) na mesma espécie, durante a mesma estação, em peixes pescados num mesmo local, há variação na porcentagem de gordura de um indivíduo para outro. Por êste motivo, estamos continuando as análises, determinando agora também o sexo e o grau de maturidade do peixe, para verificar sua influência no teor de lipídios.

## AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos ao Dr. Sebastião de Camargo Calazans, Diretor dos Laboratórios Regionais do Instituto Adolfo Lutz, cujo estímulo e compreensão tornaram possível a publicação dêste trabalho; ao Dr. Samuel Augusto Leão de Moura, Médico e Chefe do Laboratório Regional de Santos, que nos proporcionou todos os meios ao seu alcance para o bom andamento das pesquisas; ao Sr. Paulo Emerich de Souza, Químico dêste Laboratório Regional, que nos auxiliou na determinação das espécies dos peixes; e a D. Edith Fontes Prado, contratada pelo Fundo de Pesquisas, que colaborou no preparo do peixe para análise.

Agradecemos, outrossim, ao Entreposto de Pesca de Santos, na pessoa do seu Diretor, Dr. Joaquim Ribeiro de Moraes, pelo envio de material para exame.

---

Vide gráficos.

## RESUMO

Procurando atualizar as determinações bromatológicas na carne de pescado, oriunda de águas nacionais, a autora fêz, em 12 espécies, as seguintes determinações:

Comestível — cêrca de 50%

Água — variável

Lipídios — variável

Resíduo mineral fixo — cêrca de 1%

Protídios — cêrca de 20%

Procurou verificar a relação entre a variação do teor de lipídios e a estação do ano, mas não conseguiu determiná-la, certamente pelas dificuldades que encontrou na amostragem.

## SUMMARY

The author reports the following analyses performed on 12 species of fish commonly available in the city of Santos, in the State of São Paulo:

Edible part — about 50%

Water — variable

Fat — variable

Ash — about 1%

Protein — about 20%

The relation between the fat content and the season of the year was not found; this was certainly due to the extremely heterogeneous samples.

## BIBLIOGRAFIA

ASSOCIATION OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis 8th ed. Washington, D. C., 1955.

ATWATER, W. O. — U. S. Commissioner's Rept. 1888. 679 p.

BESNARD, W. — Les produits d'origine marine et fluviale. Paris, Payot, 1948.

CLARCK, E. D. & L. H. ALMY — 1918 — A chemical study of food fishes. J. Biol. Chem. 33: 483-98.

JACOBS, MORRIS B., ed. — The chemistry and technology of food and food products. 2nd ed., New York, Interscience Publishers, v. 2, 1951. p. 943-55.

JEAN-BLAIN, M. — Les aliments d'origine animale destinés à l'homme. Paris, Vigot Frères, 1948. p. 399-400.

PENSO, G. — Les produits de la pêche. Paris, Vigot Frères, 1953.

SANTOS, E. — Nossos peixes marinhos. R. Janeiro, Briguiet & Cia., 1952.

SÃO PAULO. INSTITUTO ADOLFO LUTZ — Métodos de análises bromatológicas. v. 1: Análises químicas. São Paulo, Revista dos Tribunais, 1951.

STANSBY, M. E. & J. M. LEMON — U. S. Fish and Wildlife Service. Investigational Rept. n.º 1, 1941.

THURSTON, C. E. — 1959 — Composition of certain species of fresh water fish. Food Research 24 (5): 493-502.

THURSTON, C. E. — 1961 — Proximate composition of nine species of rockfish. J. Food Science 26 (1): 38.

TRESSLER, D. K. & J. McW. LEMON — Marine products of commerce. 2nd ed. Reinhold Publishing Corporation, 1951. p. 282-302.

WINTON, A. L. & K. B. WINTON — The structure and composition of foods. New York, John Wiley & Sons, Inc. v. 3, 1937. p. 431-463.

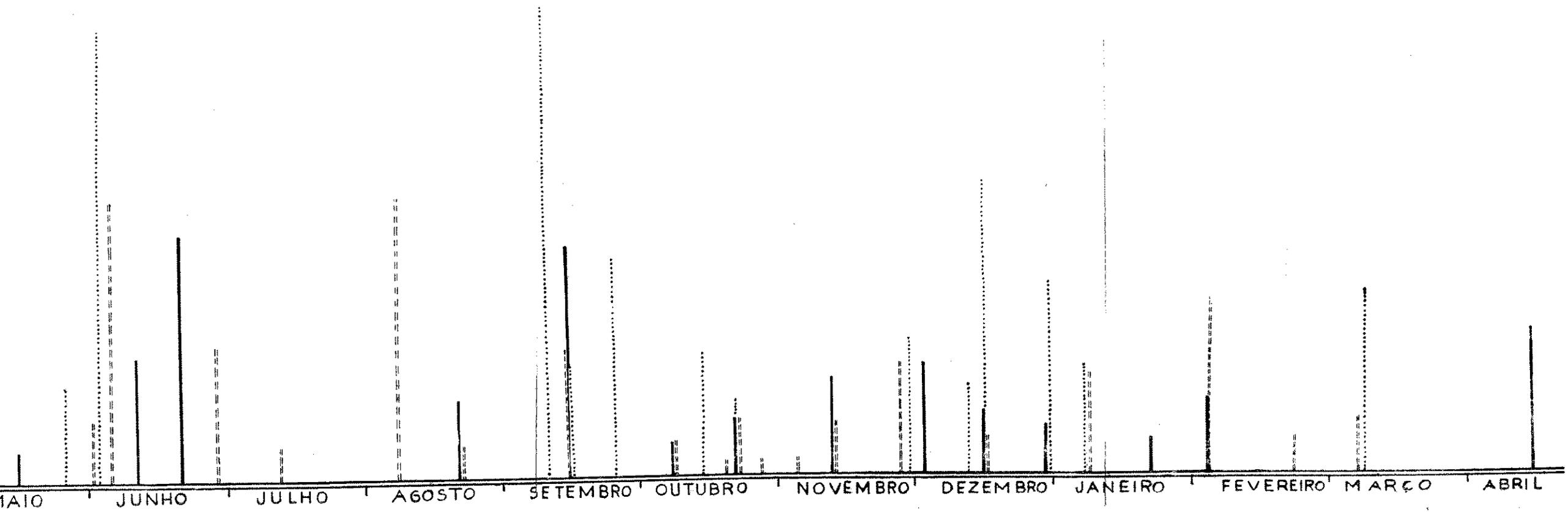
WINTON, A. L. & K. B. WINTON — Analisis de Alimentos. Tradução para o castelhano de I. J. Vallejo. Buenos Ayres, Editorial Hispano Americana, 1947. p. 64-81.

# VARIAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS EM PEIXES NOS DIFERENTES MESES DO ANO

LEGENDA

- ..... CORVINA
- GALO
- ..... BAGRE

MAIO 1960 A ABRIL DE 1961

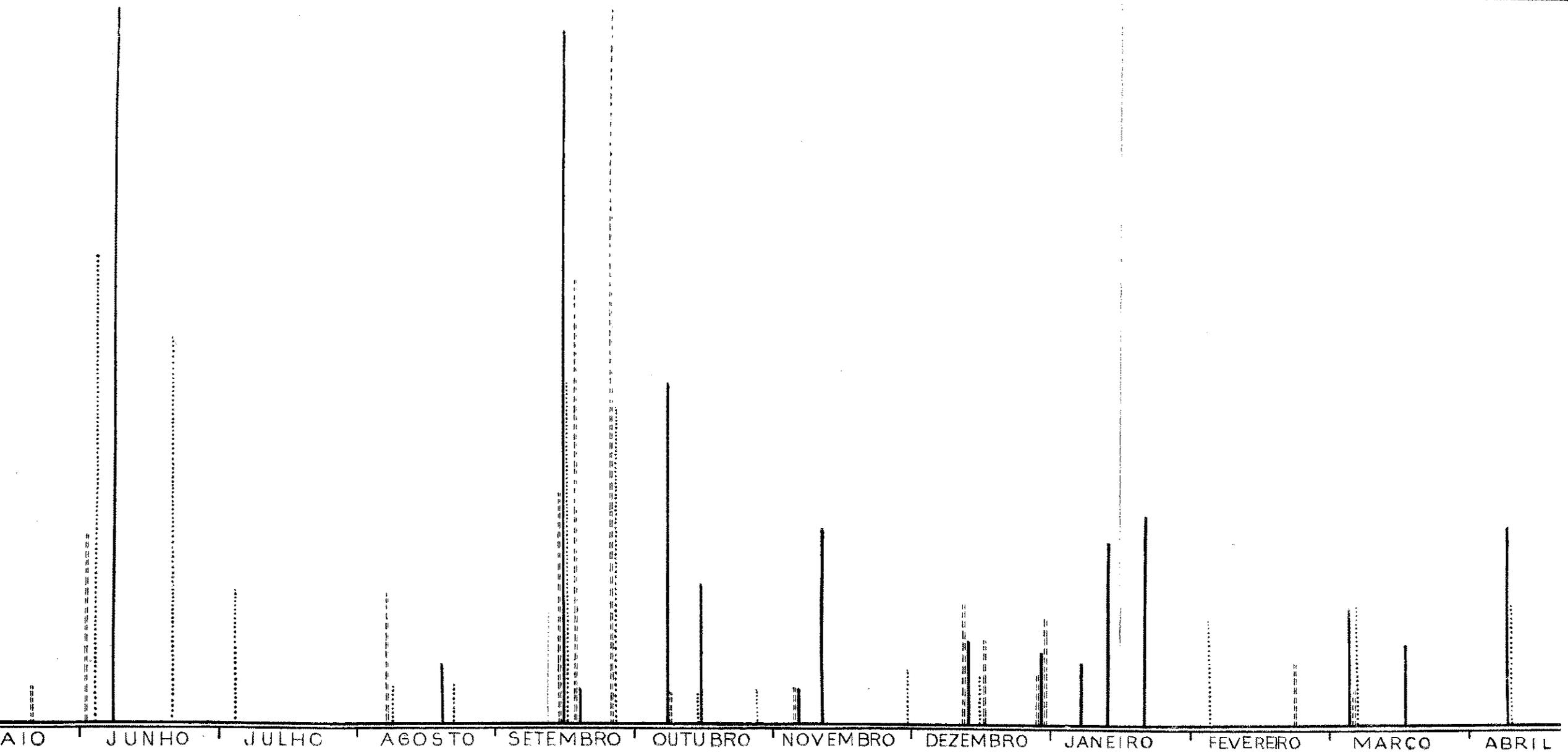


# VARIAÇÃO DO TEOR DE LIPÍDIOS EM PEIXES NOS DIFERENTES MESES DO ANO

LEGENDA

- PESCADA GOETE
- ..... PESCADA PERNA DE MOCA
- PESCADA BRANCA

MAIO 1960 A ABRIL DE 1961



# CONSIDERAÇÕES SÔBRE O CÂNHAMO, MACONHA OU DIAMBA \*

JOSÉ RIBEIRO DO VALLE \*\*

Laboratórios de Farmacologia e Bioquímica  
Escola Paulista de Medicina \*\*\*

## INTRODUÇÃO

O cânhamo, vegetal herbáceo anual da família das Moraceas (*Cannabis sativa L.*), originário da Ásia, é planta cultivada há milênios dados o valor de suas fibras, aproveitadas na indústria têxtil e o emprêgo em avicultura de suas sementes, cujo óleo é utilizado no fabrico de tintas e vernizes e, excepcionalmente, na alimentação humana. Sua cultura se espalhou por todo o globo, inclusive no nosso Nordeste, trazido ao que parece da África pelos negros escravos. Daí a sua designação de *fumo de Angola*, diamba ou maconha.

As sumidades floridas do cânhamo, mormente dos exemplares femininos, pois que se trata de vegetal dióico (fig. 1), contêm quantidade apreciável (15 a 20%) de uma substância resinosa de cheiro pronunciado que o homem aprendeu a degustar por causa dos efeitos somáticos e psíquicos experimentados.

O consumo ilícito pelos mascadores e fumantes da droga constitui, no Egito, grave problema social. Diz-se que ela era usada pela seita dos *hashishinos* tornados assassinos sob a ação tóxica da planta. Comissão técnica dêsse País concluiu: "O produto do

---

\* Trabalho baseado no Relatório apresentado à Comissão Estadual de Fiscalização de Entorpecentes, em sessão de 13 de dezembro de 1955 e na conferência pronunciada na reunião da Sociedade de Biologia de São Paulo, em 17 de dezembro de 1960.

\*\* Professor Catedrático de Farmacologia na Escola Paulista de Medicina, antigo assistente-chefe do Instituto Butantã e do Instituto Adolfo Lutz.

\*\*\* Caixa Postal 12.993. São Paulo. Brasil.

Recebido para publicação em 25-11-61.

cânhamo, de emprêgo limitado em Medicina, pode provocar alteração profunda das células nervosas, levando assim o indivíduo a praticar atos violentos e até assassinatos; a droga deve merecer, porisso mesmo, o ódio e o desprezo dos povos civilizados". Esta afirmação dogmática, evidentemente, não deve ser aceita *in totum* pelos farmacologistas.

A droga é objeto de comércio, mormente na Índia, onde as diversas preparações das inflorescências e das fôlhas, ricas em

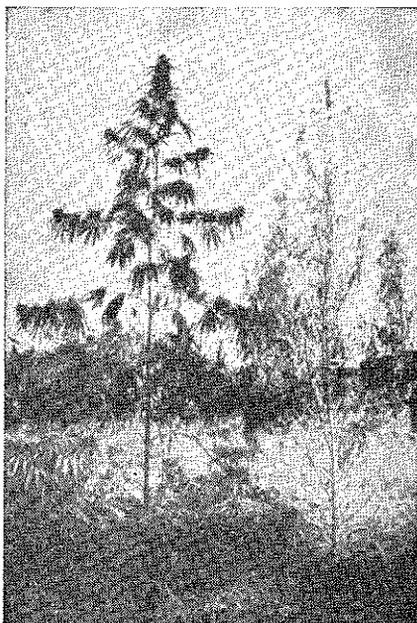


Fig. 1 — Cânhamo ou maconha plantada nos Estados Unidos (cf. Fig. 6 do livro de R. P. Walton). Figura original de Dewey, cortesia de J. E. Lippincott Co.

substância ativa, recebem designações várias como *ganjah*, *bhong* e *hashish* e são empregadas na fabricação de cigarros e confeitos, êstes últimos mastigados ou deglutidos.

Batendo-se os ramos do cânhamo em panos grossos, a resina adere à fazenda da qual é retirada depois praticamente livre do vegetal. À massa resinosa assim preparada se aplica o nome de *charas* ou *churrus*.

Nos Estados Unidos, a toxicomania pelo cânhamo ou *marihuana* despertou a atenção das autoridades e dos técnicos que concluíram pelo perigo da droga. Na última lista publicada pelo *Federal Register*, de 1957, figura o cânhamo ao lado dos barbituratos, da cocaína e do ópio entre as substâncias que induzem ao hábito, devendo, pois, o seu comércio

ser expressamente combatido com o apoio da legislação coercitiva em vigor.

No México, a Polícia Federal mantém patrulhas, inclusive aéreas, para fiscalização e erradicação da planta em todo o país.

Depois da libertação da França pelas fôrças aliadas na última guerra, as autoridades militares tiveram de combater a expansão do uso do cânhamo cultivado naquele País. Os cigarros apreendidos foram enviados aos laboratórios franceses que não sòmente

identificaram a droga presente mas ainda dela obtiveram, por extrações com éter de petróleo, produtos biologicamente ativos.

No Brasil, desde 1937, a maconha é considerada entorpecente, ficando proibida por lei inclusive a sua plantação em território nacional. Entretanto, apesar de os efeitos deletérios da maconha serem realçados por muitos especialistas, há outros que duvidam de que a planta seja realmente prejudicial ao homem. Daí, talvez, a indecisão das autoridades em tomar medidas drásticas de repressão ao uso da maconha. Trata-se ou não de droga perigosa? Não seriam os fumantes, mascadores ou comedores da maconha, tão somente vítimas de sugestões coletivas, por exemplo, nos *clubs* de diambistas? A constituição psicopática do fumante, as condições ambientes seriam tudo e a própria maconha quase nada, mero desencadeante das reações mórbidas observadas... Fôsse esta a verdade e mesmo assim o tráfico da planta deveria ser rigorosamente combatido por incrementar, de várias formas, o comércio de drogas mais perigosas. Do cigarro de diamba o jovem estudante passará facilmente para o cigarro de ópio, procurando desta maneira novas aventuras e experiências!

Ao rever a literatura ao nosso alcance sôbre o assunto, procuramos juntar às considerações que se seguem observações que vêm sendo feitas em nossos Laboratórios e que constituirão objeto de próximas publicações mais particularizadas \*.

### A PLANTA

A maconha tal como se apresenta no mercado é constituída sobretudo de ramos terminais e inflorescências de exemplares femininos, mais ou menos ressequidos, apresentando massas untuosas de cheiro característico e contendo de permeio frutos minúsculos, impròpriamente chamados sementes (fig. 2). Semeadas na primavera, em terreno bem adubado, próximo a êsses Laboratórios, obtivemos no verão exemplares dos dois sexos que alcançavam 3 metros de altura (fig. 3).

A identificação da planta vem minuciosamente descrita pelo Bureau de Narcóticos dos Estados Unidos. Sob o ponto de vista médico-legal, é óbvia a importância dessa identificação, facilitada

---

\* Muitos dados aqui referidos foram obtidos graças à cooperação de nossos estagiários e bolsistas entre os quais desejamos mencionar Moysés Zajac, Neide Hyppolito, Edson Xavier de Albuquerque, Aron Jurkiewicz e José Alves de Souza e constituíram assuntos de comunicações à Sociedade de Biologia de São Paulo.

pelo exame microscópico do material apreendido (fig. 4). Em 1955-56 examinamos 24 amostras de maconha remetidas a êstes Laboratórios pela Secretaria da Segurança Pública. Apenas num caso os exames especializados foram negativos.

Semelhante ao que ocorre com outros princípios vegetais farmacologicamente ativos, a presença e a concentração de substâncias ativas nas fôlhas e flôres do cânhamo dependem de vários fatores: da variedade da planta, da época de plantio e de colheita, da região de cultivo e da natureza do solo, das condições de acondicionamento e de transporte e do tempo que decorre entre a colheita e o consumo.

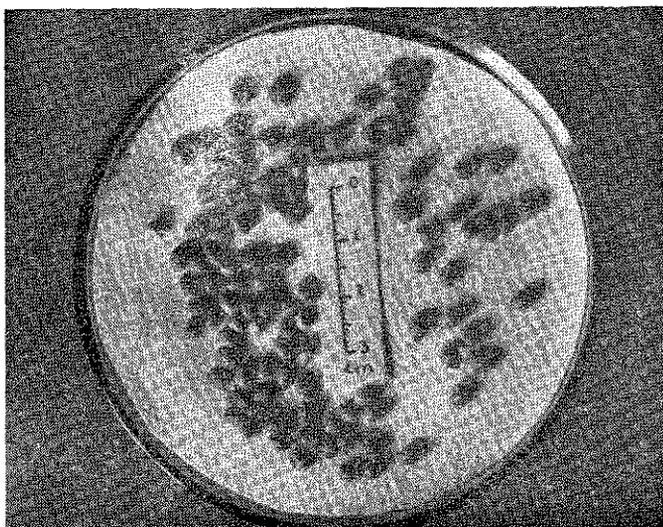


Fig. 2 — Frutos da *Cannabis Sativa*, imprôpriamente chamados sementes; plantados dão arbustos masculinos e femininos

### A QUÍMICA DA MACONHA

A atividade biológica do cânhamo depende senão exclusivamente pelo menos em grande parte do seu teor em substância resinosa a que se convencionou chamar *canabinona*; a droga deverá ser considerada perigosa se contiver mais de 7% de resina.

Vários grupos de pesquisadores, entre êles Todd na Inglaterra e Adams nos Estados Unidos, têm-se interessado pela química da *canabinona*. Do cânhamo cultivado em Minesota, nos Estados Unidos, obtém-se um óleo vermelho, ponto de partida para os estudos químicos realizados por Adams e colaboradores. Foram isolados

do cânhamo, entre outros produtos, o canabinol e o canabidiol. O canabidiol não possui atividade biológica, mas, depois da isomerização com reagentes ácidos, se transforma em tetrahydrocanabinol, bastante ativo (fig. 5). Ao que parece, os sintomas tóxicos devidos ao uso da maconha dependem da presença na *canabinona* de canabinol e tetrahydrocanabinol. A inativação da droga decorreria das alterações estruturais de natureza oxidativa desses compostos e de seus isômeros.

Adams não somente sintetizou o tetrahydrocanabinol mas preparou homólogos por substituição do grupo amílico normal por outros radicais. Assim o derivado hexílico-normal se apresentou praticamente duas vezes mais ativo do que o produto natural (fig. 6). Segundo Loewe, outros produtos sintéticos deste grupo podem apresentar até 35 vezes a atividade biológica do tetrahydrocanabinol.

Várias reações químicas têm sido propostas para a identificação dos princípios ativos do cânhamo.

Os *tests* de Beam (alcalino ou ácido), de Duquenois-Mustaphá, de Ghamrawy com o reativo de Wasicky são os mais empregados. Na tabela I (pg. 94), podemos ver que essas reações variam conforme os extratos obtidos de fôlhas ou de sementes. A reação de Beam foi negativa nas frações obtidas por cromatografia em alumina de um extrato etanólico da planta, inclusive na fração B, biologicamente ativa. Assim não há correlação entre essas reações químicas e

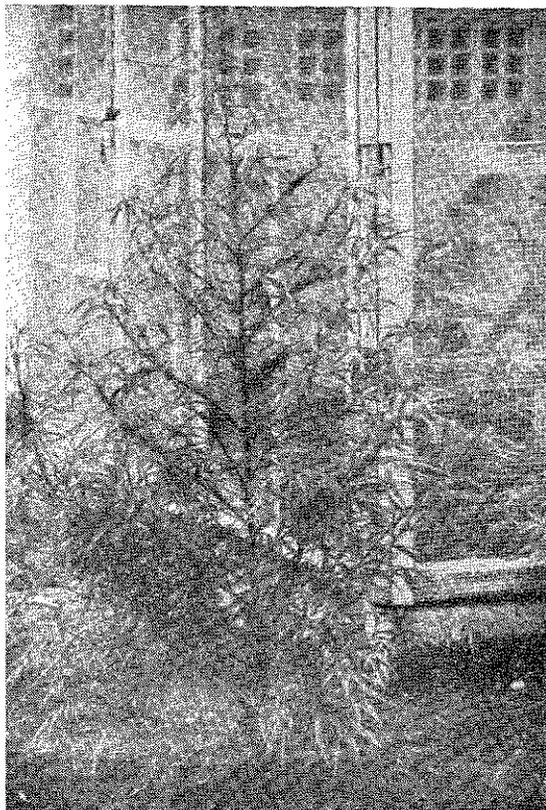


Fig. 3 — Arbusto feminino de maconha plantado nas imediações destes Laboratórios

a atividade biológica; elas também dependem da presença, na *canabinona*, de produtos como o canabidiol farmacologicamente inertes. Até agora, infelizmente, não se dispõe de método químico satisfatório para o ensaio da atividade da planta.

### ENSAIO BIOLÓGICO

Várias técnicas existem descritas na literatura para o ensaio biológico da maconha. A mais sensível é a prova de Gayer que consiste na abolição do reflexo córneo-palpebral de coelhos injetados endovenosamente com extratos etanólicos ou acetônicos convenientemente diluídos em salina.

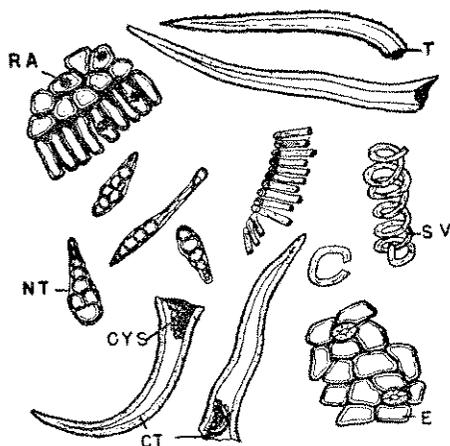


Fig. 4 — Reprodução da fig. 40 do livro de Pratt e Youngken, pág. 370. Cortesia de J. B. Lippincott Co.

Nas nossas condições experimentais observamos positividade da prova com extrato etanólico correspondente a 50 mg de pó obtido de maconha cultivada nas imediações destes Laboratórios e a 3 mg da fração B da cromatografia em alumina de outro extrato etanólico obtido de material apreendido em São Paulo.

Passando-se, por exemplo, a fumaça de um cigarro de maconha através de frascos lavadores contendo etanol (fig. 7), evaporado este, após tratamento com carvão ativado, o resíduo de cheiro penetrante e característico dissolvido em pequeno volume de acetona, diluído em salina e injetado na veia marginal da orelha de um coelho de sensibilidade conhecida, abole completamente no fim de 10 a 20 minutos a refletividade córneo-palpebral. A prova é negativa com cigarros comuns *fumados* da mesma forma, recolhida a fumaça da mesma maneira e tratado o *extrato* segundo a mesma técnica (fig. 8).

Segundo Marx e Eckhardt o canabinol bruto de Bergel provoca arreflexia mesmo na dose de 1 mg da preparação.

A prova de Dixon, baseada no emprêgo do cão e no aparecimento de fenômenos atáxicos, já foi preconizada pela farmacopéia

norte-americana. Segundo a nossa experiência, é a menos sensível. Por kg de animal, a dose atáxica no cão seria 20 vezes maior do que a dose necessária para provocar arreflexia corneana no coelho. Além desse animal, usamos o camundongo, injetado por via cerebral ou intraperitoneal, e registramos a motilidade espontânea e a excitabilidade a estímulos elétricos (fig. 9). Extratos etanólicos de maconha, tratados com carvão, provocam *quietação* dos animais na dose média de 2 mg intracerebral e 25 mg intraperitoneal, acompanhada de respostas exageradas a estímulos farádicos. Estes efei-

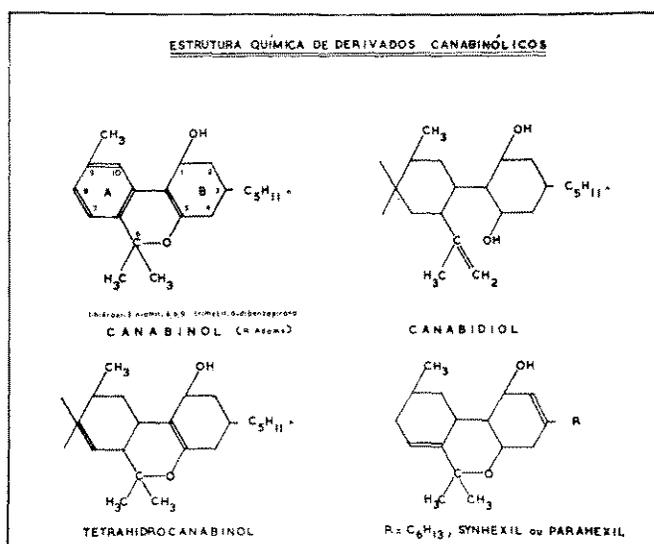


Fig. 5 — Estrutura de compostos químicos naturais e sintéticos da maconha

tos mostram que a maconha não é como os barbitúricos um deprimente do S. N. Central mas droga de ação mais complexa, do tipo catatonizante (fig. 10).

Loewe comparou os efeitos, inclusive a toxicidade de várias preparações de *Cannabis* no coelho, no cão, na cobaia e no camundongo. A catalepsia é um dos sintomas mais constantes principalmente na última espécie e a arreflexia corneana, peculiar ao coelho; o efeito letal não dependeria da atividade específica e complexa da marihuana.

Geiling no prefácio do livro de Walton escrevia em 1938: "Característica particular da marihuana é que ela age principalmente no sistema sensorial, no temperamento e na personalidade

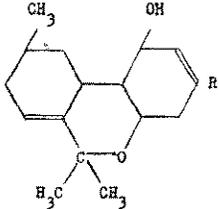
	DERIVADO R (a alquila)	INDICE DE ATIVIDADE ESTUPEFACIENTE
	- CH <sub>3</sub>	< 0.20
	- C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	0.40
	- C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	0.37
	- C <sub>5</sub> H <sub>11</sub>	1.00
	- C <sub>6</sub> H <sub>13</sub>	1.82
	- C <sub>7</sub> H <sub>15</sub>	1.05
	- C <sub>8</sub> H <sub>17</sub>	0.66

Fig. 6 — Exemplos de derivados sintéticos canabinóicos, segundo Covello, 1947

do indivíduo e estes efeitos praticamente não são mensuráveis pelos métodos comuns de laboratório. Assim, para se estudar a sua ação, nós dependemos na verdade das reações subjetivas das pessoas que receberam a droga, sendo que o relato das mesmas

varia muito, de acôrdo com a estrutura psicológica, com os efeitos experimentados e com a capacidade de descrevê-los”.

Hoje a situação é diferente. Graças a novas técnicas empregadas no estudo de drogas psicotrópicas (fig. 11) é possível demonstrar os efeitos da maconha. O registro da motilidade espontânea de camundongos e a *quietação paradoxal* dos animais inje-

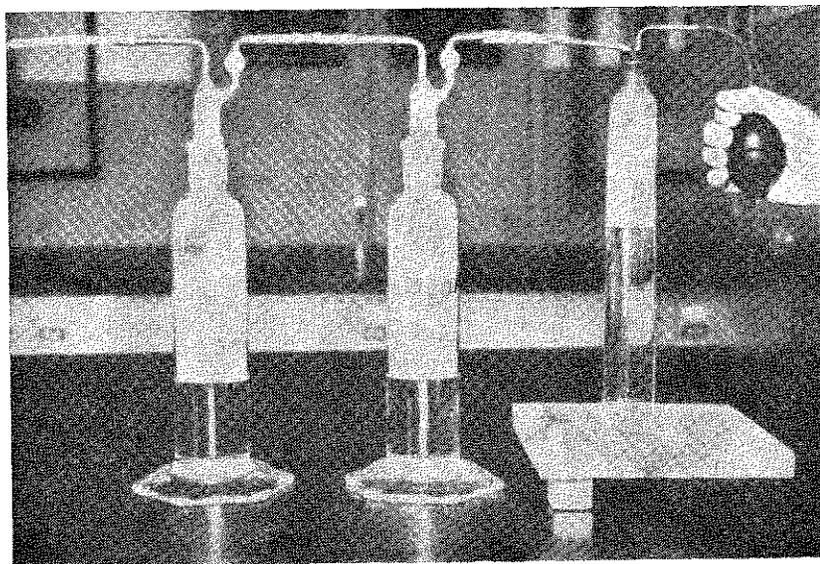


Fig. 7 — Dispositivo simples para reter os princípios ativos da fumaça de cigarro de maconha pela passagem através de frascos lavadores contendo cada um 200 ml de etanol a 96%

tados com material ativo merecem porisso a nosso ver mais amplas indagações.

Em suma, se ainda não possuimos um método biológico seguro para o ensaio quantitativo da maconha, o valor do *test* de Gayer como prova qualitativa é indiscutível.

### A MACONHA COMO ENTORPECENTE

Baseado em experiências realizadas apenas em dois casos — um médico de 31 anos que fumou 2 cigarros e um servidor de 55 anos que chegou a fumar 4 cigarros de maconha e que não apresentaram sintomas mais sérios — Jayme Pereira, apesar de reconhecer o perigo da intoxicação canábica, conclui que, na prática, a ma-

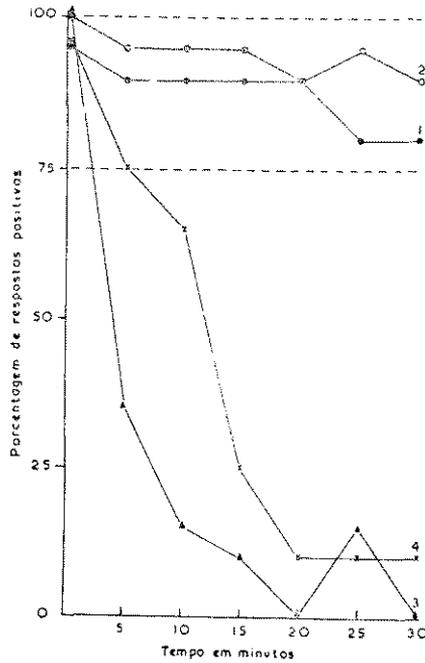


Fig. 8 — Provas de Gayer: *negativas* com etanol a 10% (1) e com o resíduo da fumaça de um cigarro comum, retida pelo álcool (2); *positivas* com extrato etanólico da maconha (3) e com o resíduo da fumaça de um cigarro de maconha, obtido nas mesmas condições (4)

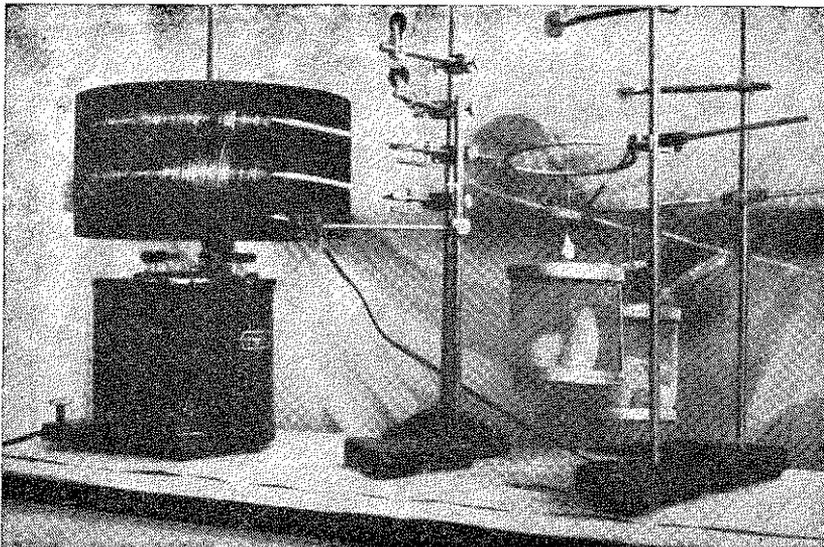
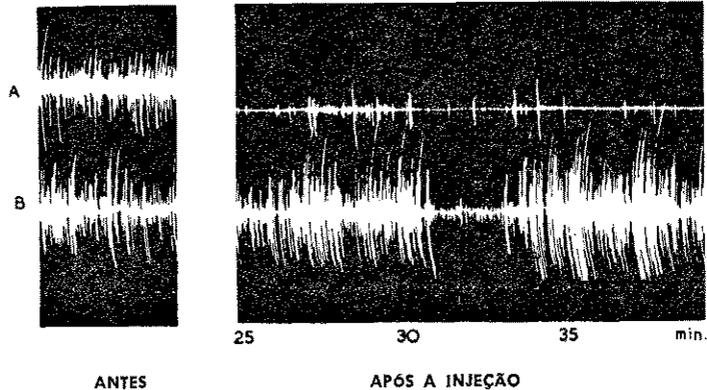


Fig. 9 — Gaiolas para o registro simultâneo da motilidade espontânea de camundongos

conha é inócua e se insurge contra as medidas coercitivas oficiais. Em contraposição, Cordeiro de Farias, Pedro Pernambuco Filho e Décio Parreiras depois de cuidadosas experiências em 16 indivíduos normais, que fumaram maconha de colheita recente e boa conservação, e depois de criteriosa revisão da bibliografia nacional, concluíram que a “resina de cannabis sativa, plantada e cultivada no território nacional, pode determinar, quando aspirada, distúrbios psíquicos em 65 por cento dos casos, distúrbios que vão desde o riso abundante e inconseqüente, até à alucinação, à loucura, à agressão e ao homicídio”.

Experiências realizadas na Clínica Neurológica da Escola Paulista de Medicina, com cigarros de material ativo fornecidos por estes Laboratórios, confirmam os efeitos da maconha no homem.



A - Animais injetados com 0,25 ml (25 mg) de extrato etanólico de CANNABIS SATIVA L.  
B - Animais testemunhas injetados com 0,25 ml de etanol 8% (veículo)

Fig. 10 — Efeitos de extrato etanólico de maconha sobre a motilidade espontânea de camundongos injetados intraperitonealmente

Jayme Pereira dá muita ênfase às conclusões negativistas do relatório La Guardia a propósito do vício da *marihuana* em Nova York. Das opiniões contrárias aos termos do célebre relatório, a de Anslinger é das mais serenas e dignas de maior consideração. Muitos argumentos daquele farmacologista giram em torno da conceituação de *entorpecente*, substância causadora de *adição* (*addictio*). Esta palavra expressa a idéia de dono ou senhor e era usada pelos romanos no sentido de rendição ao vencedor que se tornava proprietário do vencido.

Por analogia, a substância entorpecente se torna dona ou senhora do toxicômano, convertido em escravo do vício. É óbvio

que o grau e a natureza dessa escravatura variam com as qualidades ou os defeitos do vencedor e do vencido. Isbell e Frazer dizem preocupar-se com o problema da *addição*, não tanto porque os viciados ficam na dependência da droga mas porque os efeitos desta são prejudiciais ao indivíduo e à sociedade. "Addiction is a state of periodic or chronic intoxication in which an individual compulsively abuses a drug to such an extent that the individual or society is harmed".

EM CONCLUSÃO: a química e a farmacologia do cânhamo ainda apresentam problemas que estão a exigir a atenção dos pes-

DROGAS FRENOTRÓPICAS

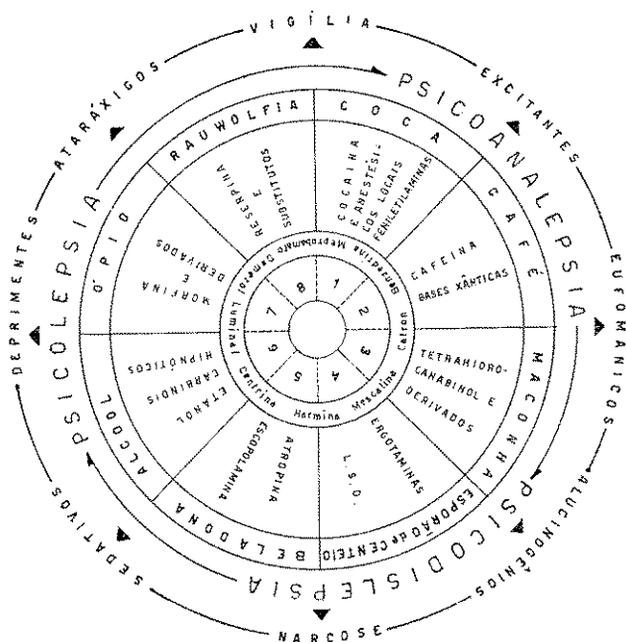


Fig. 11 — Esquema das drogas frenotrópicas adaptado de Friesenwinkel e Stach. A maconha aparece entre as eufomânicas e psicodislépticas

quisadores. Do progresso neste terreno dependerá, naturalmente, a melhor compreensão dos efeitos da maconha no homem.

Do que ficou dito e do que já se sabe a respeito, não se pode deduzir que a maconha seja inócua. Não se deve, portanto, excluir o cânhamo das listas internacionais de drogas perigosas para o indivíduo e para a sociedade. Mesmo que a droga traficada entre nós seja pouco ativa, na eventualidade dos fatores referidos ante-

riormente, o seu emprêgo deverá ser evitado e a expansão de seu consumo combatida com vigor, principalmente através de medidas educacionais.

TABELA I  
REAÇÕES CORADAS DE EXTRATOS DE MACONHA

MATERIAL \ REAÇÕES	BEAM alcalino	DUQUENOIS- MOUSTAPHA	GHAMRAWY (r. Wasicky)
Mac. I .....	+	++	++
Mac. II .....	+	++	++
Sementes .....	+++	—	—
Fr. A * .....	—	++++	+
Fr. B .....	—	+++	++
Fr. C .....	—	+	+
Fr. D .....	—	—	—

\* Frações obtidas por cromatografia em alumina de extrato etanólico.

## SUMMARY

The *Cannabis* problem was considered in this paper and the potential danger of the drug to individuals and to the Society was emphasized.

Brazilian hemp is biologically active and the intensity of its action in animals and human beings depends, as usual, on different factors as the source, ageing process and dryness condition of the sample at hand.

Despite the argument that our marihuana is less active than the oriental one, a statement still awaiting for comparative bioassays, coercitive measures must be reinforced in order to prevent expansion of this drug addiction.

## BIBLIOGRAFIA

- ABDULLA, A. — 1953 — Cannabis indica als Volkssenche in Aegypten. Schweiz. Med. Wschr. 83: 541-543.
- ADAMS, E. N. — Drug addiction. Londres, Oxford, Med. Publ., 1937. 173 p.
- ADAMS, R. — 1940 — Marihuana. Science 92: 115-119.
- ALLPORT, N. L. — The chemistry and pharmacy of vegetable drugs. New York, Brooklin, Cheni. Publ. Co. Inc., 1944. 252 p. (Cf. p. 133).
- ANSLINGER, H. J. — Criminal and psychiatric aspects associated with marihuana. Evanston, Ill., The Signal Press. 4 p.
- ANSLINGER, H. I. — 1945 — More on Marihuana and Mayor La Guardia's committee report. J. A. M. A. 128: 1187.
- ARRUDA, J. — Aspectos psiquiátricos da intoxicação pela maconha. Publicado na Acta da Secção de 26 de março de 1956 da Com. Est. Fiscal. Entorp., S. Paulo.
- BOSE, B. C. & B. MUKERJI — 1943 — Physiologically active fractions of Indian hemp. Nature 152 (3847): 109-110.
- CARDOSO, E. — Convênio Interestadual da Maconha. Recife, Impr. Oficial, 1946. 20 p.
- FARIAS, R. C. — Campanha contra o uso da maconha no norte do Brasil. Rio de Janeiro, Impr. Nacional, 1943. 11 p.
- COVELLO, M. — 1947 — Ricerche chimiche e farmacologiche sulla "Cannabis indica" coltivata in Italia. I. Relazioni fra i caratteri chimico-analitici e l'attività farmacologica. Il Farmaco 2: 503-517.
- COVELLO, M. — 1948 — Ricerche chimiche e farmacologiche sulla "Cannabis indica" coltivata in Italia. II. Degradazione dell'attività biologica della droga in rapporto all'invecchiamento e separazione cromatografica delle frazioni attivi dagli estratti alcoolico ed etereo. Il Farmaco 3: 7-12.
- CRUZ, A. O. — 1936 — Síndrome catatonica experimental pela bulbocapnina, pela fava de cumarú, pelo cânhamo indiano e pela harmina. Rev. Med. Paraná 5: (10): 377-402.
- DRILL, V. A. — Pharmacology in Medicine (A collaborative text-book). 2nd ed., New York, McGraw-Hill Book Co., 1953, p. 244.
- FRIESEWINKEL, H. & K. STACH — 1959 — Psychiatrische Pharmakotherapie — ein gordischer Knoten? Ther. des Monats 9 (2): 38-49.
- FULTON, C. C. — 1942 — Analytical classes of cannabinol compounds in Marihuana resin. Ind. Eng. Chem. (Anal. ed.) 14: 407-12.
- GADDUM, J. H. — Pharmacology. 5.<sup>a</sup> ed. London, Oxford Univ. Press, 1959. 587 p. (cf. p. 152).
- GAYER, H. — 1928 — Pharmakologische Wertbestimmung von orientalischem Haschisch und Herba Cannabis indica. Arch. f. Exp. Path. u. Pharmakol. 129: 312-18.
- GIULLA, L. — 1950 — Intoxicados pela maconha em Pôrto Alegre. Fol. Med. 31: 173-5.

GOODMAN, L. & A. GILMAN — The pharmacological basis of therapeutics (A textbook of pharmacology, toxicology & therapeutics for physicians & medical students). 2nd ed. New York, The MacMillan Co., 1955. 1831 p. (cf. p. 74).

HAAGEN-SMIT, A. J. *et alii* — 1940 — A physiologically active principle from *Cannabis sativa* (marihuana). *Science* 91 (2373): 602-3.

HAMILTON, H. C. — The pharmacopocial requeriments for *cannabis sativa*. Coll. Papers from the Res. Lab. Parke Davis & Co., Detroit, Michigan, v. 1: 157-61. (in *J. Amer. Pharm. Ass.* — 1912 — 1 (3): 200-203).

HAMILTON, H. C., A. W. LESCOHIER & R. A. PERKINS — 1913 — The physiological activity of *Cannabis sativa*. *J. Amer. Pharm. Ass.* 2: 22-23.

HAMILTON, H. C. — 1915 — *Cannabis sativa*. Is the medicinal use found only in the Indian grown drug? *J. Amer. Pharm. Ass.* 4: 448-51.

HAMILTON, H. C. — 1919 — Pharmacological assaying historical and descriptive. *J. Amer. Pharm. Ass.* 8: 49-64.

HOEHNE, F. C. — Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais (Cole-tânea de aulas. Depart. Bot. Est. São Paulo). Rio, Graphicars, 1939. 355 p. (cf. p. 103).

IGLESIAS, F. A. — 1918 — Sôbre o vício da diamba. *Ann. Paul. Med. Cir.* 9: (1): 274-81.

ISELL, H. & H. F. FRAZER — 1950 — Addiction to analgesics and barbiturates. *Pharmacol. Rev.* 2: 355-97.

KARBE, H. — 1951 — Haschisch. *Arzneim. Forsch.* 1: 37-43.

KRANTZ JUNIOR, J. & C. J. CARR — The pharmacological principles of medical practice. 3.<sup>a</sup> ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1954. 1183 p. (cf. p. 519).

LOEWE, S. — 1945 — The chemical basis of marihuana activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 84: 78-81.

LOEWE, S. — 1946 — Studies on the pharmacology and acute toxicity of compounds with marihuana activity. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 88: 154-61.

LOEWE, S. — 1950 — Cannabiswirkstoffe und Pharmacologie der Cannabinole. *Arch. Exp. Path. u. Pharmacol.* 211: 175-93.

LUCENA, J. — 1935 — Os fumadores de maconha em Pernambuco. *Rev. Med. Pernambuco* 5: 355, 391, 429, 467.

MACDONALD, A. D. — 1941 — The actions and uses of hemp drugs. *Nature (London)* 147: 167-8.

MARCOVITZ, E. & H. J. MYERS — 1944 — The marihuana addict in the Army. *War Medicine* 6: 382-94.

MARX, H. & G. ECKHARDT — 1933 — Tierexperimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Haschisch. *Arch. Exp. Path. u. Pharmacol.* 170: 395-406.

MAURER, D. W. & V. H. VOGEL — Narcotics and narcotic addiction. Springfield, Mass., C. C. Thomas Publ., 1954, 303 p.

MERRIL, F. T. — Marihuana the new dangerous drug. Washington, Opium Research Committee, 1950. 48 p.

MILLAN, J. S. — La marihuana. Estudio medico y social. Mexico, Ed. Cultura Mexico, 1939. 159 p.

MUNCH, J. C. — Manual of biological assaying. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1937. 179 p. (cf. p. 42).

OLIVEIRA, E. — 1952 — A diambomania no Brasil. *Imprensa Med. (Rio)* 28 (464): 41.

PEREIRA, J. R. — 1945 — Contribuição para o estudo das plantas alucinatórias, particularmente da maconha (*Cannabis sativa* L.). *Rev. Flora Medicinal* 12 (3): 83-210.

PEREIRA, J. R. — 1949 — O perigo social da maconha. *Arq. Pol. Civil de S. Paulo* 17/18 67-72.

PEREIRA, J. R. — A maconha como planta alucinatória, entorpecente ou viciante. S. Paulo, Com. Est. Fisc. Entorp. (in Acta da Secção de 27 de dezembro de 1955).

PERES, H. — 1937 — Toxicoses sociais. *Diambismo. Illustr. Med. (Rio)* 3 (24): 73-80.

PLICHET, A. — 1952 — Le haschich. *Presse Med.* 60 (61): 1523-4.

POWELL, G. *et alii* — 1941 — The active principle of marihuana. *Science* 93 (2422): 522-23.

PRADO, A. B. — 1959 — Contribuição para o conhecimento da maconha brasileira. *An. Farm. Quim. S. Paulo* 10: 1-16.

PRATT, R. & H. W. YOUNGKEN JUNIOR — Pharmacognosy (The study of natural drug substances and certain allied products). Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1951. 644 p.

ROSADO, P. N. G. S. — Estudo dos distúrbios nervosos produzidos pelo uso da maconha. Tese da Fac. Med. Pará. Belém, Ofs. Graf. Rev. Veterinária, 1954. 249 p.

SIQUEIRA, A., R. WASICHY & T. N. TOLEDO — Alguns aspectos científicos do problema da maconha. S. Paulo, Serv. Graf. Secret. Seg. Pública, 1959. 25 p.

TAYLOR, E. C. & E. J. STROJNI — 1960 — The synthesis of some model compounds related to tetrahydrocannabinol. *J. Amer. Chem. Soc.* 82: 5198-202.

TODD, A. R. — 1940 — Chemistry of hemp drugs. *Nature (London)* 3713: 829.

VALLE, J. R. — Considerações sobre o cânhamo, maconha ou diamba. S. Paulo, Com. Est. Fiscal. Entorp. (in Acta da Secção de 13 de dezembro de 1955).

WALTON, R. P. — Marihuana. America's new drug problem. Philadelphia, J. B. Lippincott Co., 1938, 223 p.

WILKINSON, P. B. — 1929 — *Cannabis indica*: an historial and pharmacological study of the drug. *Brit. J. Inebriety* 27: 72-80.

WOLF, P. O. — La marihuana en la America Latina. La amenaza que constituye. El Ateneo, B. Aires, 1948.

WORK, T. S., F. BERGEL & A. R. TODD — 1939 — The active principles of *Cannabis indica* resin. *Biochem. J.* 33: 123-7.

WRIGHT, A. H. — Hemp. *Encycl. Britan.* v. 11, 1953, p. 420.

\* \* \*

Campanha contra entorpecentes. Rio, Imprensa Naval, 1958. 8 p.

Instruções gerais sobre o uso e o comércio de entorpecentes. 2.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Com. Nac. Fisc. Entorpecentes, 1960, publ. 5. 23 p.

Maconha. Coletânea de trabalhos brasileiros. 2.<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro, Serv. Nac. Educac. Sanitária, Minist. Saúde, 1958. 386 p.

Marihuana. Its identification. U.S. Treasure Dep. Bureau of Narcotics. Washington, Gov. Print. Off., 1948. 41 p. e 31 fig.

Marihuana problems (Editorial) — 1945 — J. A. M. A. 127: 1129.

Mayor's Committee on Marihuana. The marihuana problem in the city of New York. Lancaster, Pa., The Jacques Cattell Press, 1944.

Simposio sôbre o problema da maconha (São Paulo). Publ. n.º 13 da Com. Nac. Fisc. Entorpecentes. Rio de Janeiro, Gráfica & Edit. Brasiluso S.A., 1961, 23 p.

Textos da Legislação Bras. vigente sôbre entorpecentes. Publ. n.º 3 da Com. Nac. Fisc. Entorpecentes, Rio de Janeiro, 1959. 72 p.

\* \* \*

#### NOTA ACRESCENTADA DURANTE A CORREÇÃO DAS PROVAS

Novas preparações de maconha extraída com éter de petróleo foram obtidas e estudadas após cromatografia dos extratos em coluna de óxido de alumínio. A fração Cr16 Fr20, por exemplo, revelou características de tetrahidrocanabinol ou isômeros: solução amarelo-forte com fluorescência azul à luz ultravioleta, mancha única e Rf 0,88 à cromatografia em papel, reação de Ghamrawy- Wasicki positiva, coloração castanha com o reativo de Duquenois-Negm e prova biológica de Gayer positiva com 0,25 mg.

# CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO IMUNOLÓGICO DA BLASTOMICOSE DE LUTZ (BLASTOMICOSE SUL-AMERICANA)\*

CELESTE FAVA NETTO \*\*

Numerosos pesquisadores têm dedicado seus esforços ao estudo imunológico das micoses profundas. Procuraremos fazer revisão limitada da literatura pertinente ao assunto, para justificarmos nossos estudos na blastomicose de Lutz.

Convém assinalar que não pretendemos fazer revisão da literatura referente a tôdas as micoses profundas, mas somente àquelas que, dada sua frequência ou gravidade, mereceram estudos mais pormenorizados dos pesquisadores. Sabemos, também, que não poderíamos fazer revisão completa do assunto, mas a introdução terá por finalidade somente a de situar a imunologia da blastomicose sul-americana dentro do campo mais vasto, e já em parte explorado, da imunologia das micoses profundas.

*Coccidioidomicose* — Esta micose era considerada rara e grave, levando freqüentemente à morte, até que, de 1935-1938, DICKSON & GIFFORD (1938) fizeram descoberta revolucionária, qual seja, a existência da coccidioidomicose-infecção, que se manifesta na maioria das vezes como moléstia respiratória benigna. Os estudos clínicos, associados aos imunológicos, permitiram a individualização das várias formas de coccidioidomicose, sendo que SMITH (1943) fez a seguinte classificação clínica:

A — Infecção inicial ou primária

- 1) Inaparente
- 2) Respiratória aguda, “gripal” ou “pneumônica”

---

\* Tese para concorrer à docência-livre de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de S. Paulo. São Paulo, 1960.

\*\* Assistente do Departamento de Microbiologia e Imunologia da F.M.U.S.P. (Diretor: Prof. Carlos da Silva Lacaz).

Recebido para publicação em 19 de novembro de 1960.

3) Cada um dos tipos anteriores ou ambos, associados com eritema nodoso ("San Joaquin fever", "Valley fever", "desert fever", "desert rheumatism")

4) Forma pulmonar escavada

B — Forma progressiva (secundária; com infecção disseminada; "San Joaquín Valley disease")

Posteriormente, WILSON & colab. (1953) descreveram caso de coccidioidomicose cutânea primária, dando individualização a esta nova manifestação clínica, através de vários critérios. Estas várias formas clínicas da coccidioidomicose se encontram bem individualizadas no livro de WILSON (1957) e também no de CONANT & colab. (1954).

Na coccidioidomicose as seguintes provas imunológicas têm sido empregadas correntemente:

- a) Reação de fixação do complemento
- b) Reação de precipitação
- c) Prova intradérmica ou reação à Coccidioidina

O antígeno utilizado é o mesmo para todas as provas. Corresponde à coccidioidina, filtrado de cultura de *Coccidioides immitis* em meio sintético, cuja padronização é referida por SMITH & colab. (1950). O componente antigênico é um polissacarídeo que pode ser purificado a partir do filtrado. No entanto, o polissacarídeo purificado funciona como antígeno somente nas reações de precipitação e intradérmica. Somente o filtrado total funciona como antígeno na reação de fixação do complemento, segundo HASSID & colab. (1943). Também o aquecimento lhe retira o poder de fixar o complemento (WILSON, 1957; SMITH & colab., 1950). Segundo alguns pesquisadores, todas as amostras de *Coccidioides immitis* são capazes de produzir coccidioidina-antígeno, quando cultivadas nas condições já indicadas. Haveria falhas incontrolláveis, como por exemplo, quando vários frascos de culturas são semeados com a mesma amostra e nas mesmas condições, um dos frascos poderá não revelar poder antigênico no filtrado ou acusar somente poder antigênico muito fraco (SMITH & colab., 1950). Segundo outros, há diferenças no que diz respeito à quantidade e rapidez de liberação do polissacarídeo, por diferentes amostras (PAPPAGIANIS & KOBAYASHI, 1958). A coccidioidina não diluída é estável por 10 anos e diluída o é por vários meses (SMITH & colab., 1948; 1950).

As seguintes conclusões foram obtidas pelo emprego das provas imunológicas referidas:

1) A sensibilidade à coccidioidina é do tipo "bacteriano" comum e não se transmite passivamente. Uma vez estabelecida, é muito duradoura, podendo atenuar-se só lentamente. Experiência limitada não apóia a teoria de que a reexposição a ambiente coccidióidico exerça maior efeito sobre a manutenção da sensibilidade. Sensibilidade pequena à coccidioidina geralmente se associa à disseminação da moléstia. O índice de sensibilidade apresenta valor prognóstico, porque em vários casos notou-se aumento da sensibilidade acompanhando a melhora dos pacientes. A coccidioidina não é significativamente antigênica e uma prova positiva indica coccidioidomicose. As provas intradérmicas não promovem a formação de anticorpos humorais e podem ser realizadas antes da pesquisa destes. Ao realizar a prova, deve-se tatear a sensibilidade dos pacientes, pois reações fortemente positivas podem ocorrer; estas, no entanto, não pioram lesões quiescentes, não provocam disseminação, nem prejudicam a moléstia aguda inicial (SMITH & colab., 1948). Aproximadamente 60% das infecções são assintomáticas, revelando-se somente pela prova da coccidioidina. A conversão da coccidioidina se dá em 87% dos casos na 1.<sup>a</sup> semana da infecção e em 99% dos casos na 2.<sup>a</sup> semana. Pacientes com coccidioidomicose primária e eritema nodoso podem reagir fortemente a 0,1 ml de coccidioidina a 1/1.000. Também uma primeira prova positiva na diluição de 1/100 pode agravar o eritema nodoso ou mesmo provocar o seu aparecimento. Pacientes hipersensíveis à coccidioidina podem reagir cruzadamente à histoplasmina e à blastomicetina, mas em menor intensidade (SMITH & colab., 1949). É conveniente, portanto, nos casos duvidosos, realizar provas intradérmicas com os três antígenos simultaneamente. Provas repetidas não condicionam o aparecimento de anticorpos cuti-sensibilizadores, nem de anticorpos humorais (CONANT & colab., 1954).

2) Em mais de 21.000 provas simultâneas, de precipitação e de fixação do complemento, SMITH & colab. (1950) verificaram que elas revelam menos que 10% das formas pulmonares assintomáticas e mais que 90% das formas pulmonares sintomáticas. Estas provas confirmaram 3/5 das cavidades pulmonares coccidióidicas e 99% das formas disseminadas. Entre 3.219 pacientes com infecção primária, somente precipitinas foram demonstradas em 44% dos casos e a prova de fixação do complemento foi positiva, isoladamente, em 22% dos casos. Estas provas sorológicas foram positivas somente após o aparecimento da alergia, desde que não houvesse disseminação associada com anergia. Portanto, a prova à coccidioidina serve como eliminatória. Para o diagnóstico, a

prova de precipitação é mais útil, se bem que na 1.<sup>a</sup> semana somente metade dos casos apresenta reação positiva. Em duas semanas, 90% dos casos são positivos. Muitos soros perdem as precipitinas dentro de 3 meses. A prova de fixação do complemento continua a positivar-se por 3 meses. A sua negatificação é lenta, 1 ano ou mais.

O título em anticorpos fixadores do complemento aumenta com a gravidade do caso. Enquanto que se encontra título superior a 1/16, menos que uma vez em 40 casos de coccidioomicose localizada, em casos de coccidioomicose disseminada, mais que a metade apresenta títulos superiores a 1/16. Os pacientes que, ao lado da reação de fixação do complemento com altos títulos, apresentarem reação intradérmica negativa, têm mau prognóstico. SMITH & colab. (1950) demonstraram ainda anticorpos precipitantes e fixadores do complemento no líquido, em casos de comprometimento nervoso e ainda em líquidos pleurais e peritoniais nos casos de comprometimento dessas serosas. COHEN (1949), estudando a coccidioomicose em crianças, apresenta conclusões semelhantes.

*Histoplasmore* — Também nesta infecção micótica, nossos conhecimentos se iniciaram pela forma grave, progressiva e fatal. Os pacientes, ao lado de quadro infeccioso, apresentam perda de peso, hepatosplenomegalia, anemia, leucopenia e, nas crianças, sinais de comprometimento intestinal. A maioria dessas manifestações indica comprometimento generalizado do S.R.E. Nos adultos ela dura de 3 semanas a 8 meses, mas alguns casos ficam crônicos durante anos, para depois morrerem em poucas semanas, por ocasião de disseminação da moléstia.

Segundo WILSON (1957), a histoplasmore constitui exemplo, dos mais evidentes, de que ainda são possíveis progressos rápidos nos conhecimentos médicos, pois nos últimos 10 anos, os que se referem a essa micose, sofreram impulso extraordinário. Realmente, agora sabemos que, em determinadas áreas endêmicas, numerosas pessoas se infetam pela inalação de esporos de *Histoplasma capsulatum* e, apesar de raramente se tornarem enfêrmas graves, com perigo de vida, a maioria mostra uma ou outra evidência de ter tido a moléstia. Segundo WILSON ainda, foi CHARLES E. SMITH, o grande estudioso da imunologia da coccidioomicose, quem sugeriu poder ser a histoplasmore a causa de muitas das calcificações pulmonares não tuberculosas, encontradas na população da parte centro-leste dos Estados Unidos. Inquéritos epidemiológicos, realizados com a prova da histoplasmina, vieram confirmar aquela

suposição e, ainda mais, revelar que a histoplasmose existe endêmicamente, em maior ou menor proporção, no mundo todo.

Vejam, no entanto, como a caracteriza clinicamente FURCLOW (1956), um dos grandes conhecedores da histoplasmose. Distingue este autor as seguintes formas clínicas:

A — Histoplasmose grave

- 1) Tipo progressivo crônico (de reinfecção ou cavitário).
- 2) Tipo agudo progressivo. Dura em média 6 semanas e é fatal. É o tipo geralmente descrito na literatura.
- 3) Tipo agudo epidêmico. Pneumonite disseminada. Não é progressivo e evolui para a cura. Ocorre em adultos, virgens da infecção.

B — Histoplasmose moderadamente grave. Dura de 5-15 dias, com sintomatologia semelhante à da influenza. Recidivas ocorrem com certa freqüência.

C — Histoplasmose benigna. Sintomas de influenza, durando 1-4 dias. Supõe-se que ocorra infiltrado nodular em cerca de 2/3 dos casos.

D — Histoplasmose assintomática

Refere ainda que provas se acumulam, indicando haver reinfecção em alguns casos. Em muitos, parece que há recaída da histoplasmose já existente. Esta classificação foi possível, dada a grande experiência do Autor, no estudo dessa infecção. CONANT & colab. (1954) e WILSON (1957) distinguem menor número de variedades clínicas da histoplasmose. Todos, no entanto, assinalam a existência de formas pulmonares assintomáticas, formas pulmonares benignas e finalmente, a forma progressiva, de disseminação. Admitem, também, a porta de entrada cutânea, que segundo WILSON (1957) apresentar-se-ia com caracteres semelhantes aos da esporotricose.

Vejam quais os aspectos imunológicos estudados na histoplasmose que, em conjunto com os dados clínicos, permitiram a conceituação que acabamos de expor. Devemos, inicialmente, assinalar que as provas imunológicas foram estudadas por vários grupos de pesquisadores e, em consequência, os resultados conseguidos não fornecem conclusões tão claras quanto as da coccidioidomicose, cuja imunologia foi estudada, quase que inteiramente, pela

escola de SMITH. As provas imunológicas, já utilizadas no estudo da histoplasmose, são: a reação intradérmica, a reação de fixação do complemento, a reação de precipitação, a reação de floculação de partículas de colóidio e a aglutinação de hemácias sensibilizadas.

O antígeno mais comumente utilizado na reação intradérmica é a histoplasmina, filtrado de cultura da fase miceliana do *Histoplasma capsulatum*, em meio sintético. EMMONS & colab. (1945) referiram o meio sintético de SMITH para o preparo da histoplasmina e também da blastomicetina, coccidioidina e haplosporangina, que utilizaram no estudo de reações cruzadas. PATES (1948) demonstrou que é possível obter da histoplasmina, por purificação, frações protéicas e polissacarídicas, sendo que a fração polissacarídica se revelou mais específica nas reações intradérmicas. CROSS & HOWEL (1948) citaram o isolamento de fração polissacarídica pura, a partir da histoplasmina e em seus resultados verificaram que esta fração dava provas positivas, tanto em cobaios com histoplasmose, como também naqueles com blastomicose norte-americana por infecção experimental. Sugeriram, então, que o princípio ativo da histoplasmina é, em parte, polissacarídeo, e que se fôr determinado o título exato, êle será relativamente específico para animais infectados por *Histoplasma capsulatum*.

DYSON & EVANS (1954), com o propósito de encontrar antígenos que não apresentassem reações cruzadas como a histoplasmina obtida da fase miceliana, fizeram culturas da fase leveduriforme em meio líquido e extraíram antígenos das células leveduriformes do *H. capsulatum*. Os antígenos, extratos não purificados das células leveduriformes, não foram satisfatórios, mas frações isoladas do sobrenadante das culturas pareceram ser específicos. Os antígenos, parcialmente purificados, são constituídos principalmente por polissacarídeos e apresentam atividade biológica até na quantidade de 1 micrograma.

Os antígenos empregados nas reações de fixação do complemento são vários. O antígeno inicialmente utilizado foi simplesmente a histoplasmina, filtrado de culturas da fase miceliana do *H. capsulatum*.

Em 1947, SALVIN referiu o emprêgo de células leveduriformes mortas pelo formol, como antígeno. SASLAW & CAMPBELL (1948; 1949) e CAMPBELL & SASLAW (1948) descreveram o emprêgo de células leveduriformes mortas pelo calor, bem como extrato obtido por trituração de células leveduriformes. Êstes antígenos foram empregados com soros animais, para estudo de suas propriedades,

padronização, reações cruzadas e ainda com soros humanos. SALVIN (1950) também utilizou células leveduriformes para estudo das relações sorológicas entre vários cogumelos. Neste mesmo ano, SASLAW & CAMPBELL empregaram extrato de células leveduriformes para novos estudos com soros humanos. GRAYSTON (1952) fez boa revisão da imunologia da histoplasnose, publicando seus resultados. Empregou, como antígenos, células leveduriformes, sobrenadante de células leveduriformes trituradas e histoplasmina. Segundo seus estudos, as células leveduriformes mortas pelo calor se revelaram melhor antígeno. CAMPBELL (1953) fez tentativa de purificação dos antígenos obtidos da fase miceliana e da fase leveduriforme. HAZEN & TAHLER (1953) publicaram os resultados obtidos com soros humanos, empregando como antígeno células leveduriformes e extrato, por trituração, de células leveduriformes. CAMPBELL & BINKLEY (1953) utilizaram, como antígeno, extrato de células leveduriformes. SASLAW & CAMPBELL (1953) usaram células leveduriformes e histoplasmina. SCHUBERT & colab. (1953) estudaram 10 lotes separados de histoplasmina, para determinar a antigenicidade relativa dos mesmos em provas de fixação do complemento. SALVIN & FURCOLOW (1954) utilizaram células leveduriformes. SALVIN & colab. (1954) empregaram, como antígenos, células leveduriformes, extrato de células leveduriformes e histoplasmina. Em 1954, SORENSEN & EVANS descreveram o preparo de fração antigênica livre de proteína, para reação de fixação do complemento e que se revelou específica com soros de coelhos infetados. HAZEN & GREENE (1956) empregaram células leveduriformes mortas pelo calor e extrato de células leveduriformes (lavadas e secas em acetona). Em 1957, HAZEN & GREENE, além das células leveduriformes, utilizaram histoplasmina (filtrado de fase miceliana). Em 1957, LABZOFFSKY & colab. extraíram do *H. capsulatum*, por métodos físicos e químicos, 8 frações antigênicas, das quais 3 eram específicas para *H. capsulatum*. Em 1957, SCHUBERT & AJELLO, estudando as variações de antigenicidade em várias amostras de *H. capsulatum*, empregaram células leveduriformes. Verificaram que há variações na antigenicidade de várias amostras e aconselham a experimentação de numerosas amostras para encontrar a que ofereça antígeno mais potente.

Na prova de precipitação, os antígenos utilizados pouco têm variado. Em 1948, PATES utilizou frações obtidas da histoplasmina. Em 1953, CAMPBELL & BINKLEY usaram a histoplasmina, filtrado de cultura da fase miceliana. Com o mesmo antígeno trabalharam SALVIN & FURCOLOW (1954) e SALVIN & colab. (1954).

Na prova de floculação de partículas de colódio, também a histoplasmina (filtrado de cultura da fase miceliana) foi o antígeno utilizado por CAMPBELL & BINKLEY (1953) e SASLAW & CAMPBELL (1953), segundo técnica padronizada por SASLAW & CAMPBELL (1948; 1949; 1950).

A prova de aglutinação de hemácias sensibilizadas foi utilizada somente por NORDÉN (1949) que sensibilizou hemácias de carneiro com histoplasmina, em trabalho experimental.

Os achados que o estudo imunológico da histoplasmose oferece serão revistos brevemente a seguir.

A prova intradérmica à histoplasmina permitiu a realização de numerosos inquéritos epidemiológicos, dos quais indicaremos os seguintes: em 1948, por EDWARDS & colab.; em 1948, por FURCLOW & colab.; em 1949, por BEADENKOFF & colab.; em 1957, por EDWARDS & PALMER e o trabalho de LACAZ & colab. (1955), onde se encontram resultados de vários inquéritos realizados no Brasil. Os inquéritos epidemiológicos permitiram conhecer a extensão e a localização da endemia histoplasmótica nos Estados Unidos, com organização de mapas como o que se encontra no livro de CONANT & colab. (1954), reproduzido de PALMER. Demonstrou-se que, nos Estados Unidos, existem regiões em que a histoplasmose-infecção atinge 80% das pessoas.

Inquéritos epidemiológicos têm sido feitos em quase todos os países do mundo e, onde eles não se realizaram ainda, a publicação de casos clínicos indica ser a histoplasmose, micose ubiqüitária. Além de permitir verificar a distribuição geográfica dos reatores à histoplasmina, da relação existente entre calcificações pulmonares e histoplasmose-infecção, a prova intradérmica veio demonstrar a existência de infecções benignas, que de outro modo seriam classificadas principalmente como gripe, pois os raros casos benignos, em que o cogumelo foi isolado, representam o resultado de pesquisas exaustivas. A prova intradérmica tem valor relativo quanto ao diagnóstico, devido à elevada percentagem de reatores entre a população normal. No entanto, ela é de grande valor para o diagnóstico, quando se trata de epidemia de histoplasmose. Estudos de epidemias de histoplasmose foram feitos por FURCLOW & GRAYSTON (1952), FURCLOW & colab. (1955), LEHAN & FURCLOW (1957) e FURCLOW (1958). Outra questão, relacionada com a prova intradérmica, foi a de se saber da possibilidade de uma prova condicionar a positividade de outra ou, ainda, o aparecimento de anticorpos circulantes. Este assunto se encontra explorado nas

publicações de PRIOR & SASLAW (1952), SASLAW & CAMPBELL (1953) e SALVIN & colab. (1954). Tais trabalhos permitiram chegar à conclusão de que a reação intradérmica, negativa à histoplasmina, não condiciona a positividade de prova posterior. O mesmo acontece com várias provas seguidas, num mesmo indivíduo. Uma série de provas negativas também não estimula a produção de anticorpos circulantes. No entanto, série de provas intradérmicas em indivíduos histoplasmino-positivos estimula a produção de anticorpos circulantes, reveláveis através das provas de fixação do complemento e aglutinação de partículas de colódio. Tudo leva a concluir que os pacientes, positivos à histoplasmina, reagem à prova intradérmica, como se fosse injeção de reforço.

A pesquisa de anticorpos circulantes na histoplasmosose permitiu chegar às seguintes conclusões: só existem anticorpos fixadores do complemento, em indivíduos tidos como normais, naqueles que são histoplasmino-positivos. O título em anticorpos fixadores do complemento é significativamente mais elevado nos casos agudos que nos crônicos. Há queda no teor de anticorpos, com a melhora do paciente. Há casos de histoplasmosose comprovada em que os anticorpos fixadores do complemento estão ausentes (CAMPBELL & SASLAW, 1949). Para êstes AA. a prova de aglutinação de partículas de colódio, sensibilizadas com histoplasmina, teve comportamento igual à prova de fixação do complemento.

GRAYSTON (1952) chegou às seguintes conclusões: os casos de histoplasmosose comprovada reagiram positivamente em altos títulos, sendo que 2 casos que apresentaram títulos baixos eram de histoplasmosose crônica generalizada, próximos da morte. O título de anticorpos fixadores de complemento vai caindo com a melhora dos pacientes. Os anticorpos demoram até 8 meses para desaparecer, na sua série de casos. No mesmo trabalho, apresentou o estudo de 5 membros de uma família, que se infetaram na mesma época: 3 possuíam altos níveis de anticorpos; 2 apresentavam níveis baixos, acompanhados de infiltrados pulmonares assintomáticos. Houve queda brusca do nível de anticorpos em 1 caso, coincidindo com a disseminação da moléstia. O paciente melhorou e se recuperou em alguns meses, mas o seu soro nunca mais se apresentou positivo à prova de fixação do complemento. A queda gradual e regular nos níveis de anticorpos nos outros membros da família acompanhou a recuperação da lesão pulmonar por calcificação.

Em 1953, HAZEN & TAHLER referiram a ocorrência de reações de fixação do complemento negativas em casos comprovados de

histoplasmose. No mesmo ano, CAMPBELL & BINKLEY publicaram extenso trabalho, cujas conclusões são as seguintes: em 10 casos de lesões pulmonares primárias e limitadas, os níveis de anticorpos eram elevados, entre 1/80 e 1/2.560, apareceram muito cedo e os níveis mais altos foram encontrados nas seis primeiras semanas de infecção. Pelo 4.º mês, o título foi de 1/20 ou menor. Nos casos crônicos generalizados (sòmente 3 casos), os títulos, em anticorpos fixadores do complemento, se mantiveram altos durante o período de observação, entre 1/160 e 1/2.560. Nos casos generalizados, associados com endocrinopatias (10 casos) havia, em todos, título persistentemente baixo em anticorpos, entre 1/5 e 1/80; muitas vèzes não se conseguiu demonstrar a presença de anticorpos pela fixação do complemento. Noutra série de 14 casos, êstes AA. não demonstraram anticorpos fixadores do complemento. Êstes casos apresentavam considerável variação na sintomatologiá clínica; 8 casos de forma pulmonar benigna, do grupo, foram positivos pela prova de aglutinação de partículas de colóidio; outros 4 casos de lesões cutâneas, únicas demonstráveis, também reagiram positivamente a essa prova. Os outros 2 casos em que as lesões eram de 2 e 14 anos de duração, foram negativos por ambas as provas. SALVIN & FURCOLOW (1954) chamaram a atenção para a prova de precipitação, que pode ser positiva, na ausência de anticorpos fixadores do complemento, em casos de histoplasmose benigna. Estudaram 8 pacientes: 3 mostraram sòmente precipitinas durante 2-3 meses; 3 com moléstia mais grave, apresentaram anticorpos precipitantes e fixadores do complemento, êstes observados durante mais tempo; 2 outros pacientes crônicos, com anticorpos fixadores do complemento e precipitinas sempre presentes.

FURCOLOW & colab. (1955), numa epidemia de histoplasmose, verificaram que os anticorpos fixadores do complemento persistiram até 8 meses nos casos mais graves. SASLAW & CAMPBELL (1950) acreditam que a ausência de anticorpos circulantes em altos títulos em infecção ativa indica mau prognóstico. FURCOLOW (1956) referiu que as provas sorológicas são positivas na fase aguda e os títulos caem com a melhora dos pacientes. Os títulos geralmente são elevados durante 1 ano, mas podem assim permanecer até 5 anos, nas formas pulmonares extensas ou de comprometimento ganglionar de cura lenta. Em alguns casos de histoplasmose comprovada, as provas sorológicas continuam a ser negativas, por desconhecidas razões. As precipitinas se positivam primeiro. Títulos elevados de anticorpos fixadores do complemento ou falha no desaparecimento das precipitinas indicam mau prognóstico.

*Blastomicose norte-americana* — Na revisão da imunologia da blastomicose norte-americana vamos inicialmente chamar a atenção para a classificação clínica de suas manifestações, feita por WILSON (1957). Distingue êste Autor as seguintes formas clínicas:

- a) Blastomicose cutânea primária. Forma extremamente rara, da qual se conhecem, com certeza, 4 casos descritos por WILSON & colab. (1955)
- b) Blastomicose pulmonar primária
- c) Blastomicose disseminada
- d) Blastomicose cutânea crônica, localizada

As provas imunológicas utilizadas no estudo da blastomicose norte-americana têm sido: reação intradérmica, fixação do complemento, precipitação, floculação de partículas de colódio e aglutinação de hemácias sensibilizadas.

Como antígeno para a reação intradérmica, MARTIN & colab. (1936) utilizaram células leveduriformes mortas pelo calor. MARTIN & SMITH (1939) referiram sua experiência com êste antígeno.

PECK & colab. (1940) estudaram o isolamento e a purificação de fração polissacarídica do *Blastomyces dermatitidis*, crescido a 37°C. A purificação se fez a partir do extrato aquoso das células. Êste polissacarídeo deu, em paciente de blastomicose, reações mais evidentes e mais precoces do que as obtidas com a fração protéica ou vacina.

EMMONS & colab. (1945) prepararam blastomicetina pelo cultivo do cogumelo no meio sintético de SMITH. SCHAWARZ & BAUM (1952) utilizaram células leveduriformes mortas pelo calor. FRIEDMAN & CONANT (1953), em trabalho experimental, empregaram blastomicetina-filtrado e também células leveduriformes, para reações intradérmicas em cobaios infetados experimentalmente. MARTIN (1953) experimentou, em cobaios infetado pelo *Blastomyces dermatitidis*, sobrenadante de células leveduriformes após ruptura sônica e simples sobrenadante de suspensão de células leveduriformes. DYSON & EVANS (1954) referiram que não conseguiram isolar bons antígenos do extrato de células do *B. dermatitidis*, mas conseguiram polissacarídeo do líquido de cultura, que se mostrou mais específico. Em inquérito epidemiológico, HARRIS & colab. (1957) empregaram vacina fornecida por CONANT, a que chamaram blastomicetina.

Na reação de fixação do complemento, MARTIN (1935) empregava células leveduriformes como antígeno. O mesmo antígeno

serviu para pesquisas do referido Autor realizadas em colaboração com SMITH & DURHAN (1936) e com SMITH (1939a; 1939b). PECK & colab. (1940), estudando a purificação de polissacarídeos a partir da extração aquosa de *B. dermatitidis*, verificaram que duas frações polissacarídicas fixavam o complemento em presença de sôro imune de coelho. O mesmo acontecia com o extrato aquoso total, que se mostrava mais potente.

SASLAW & CAMPBELL (1948) empregaram células leveduriformes mortas pelo calor. CAMPBELL & SASLAW (1948; 1949) experimentaram antígeno solúvel extraído por trituração de células leveduriformes. SALVIN (1949) utilizou células leveduriformes e em 1950 empregou o mesmo tipo de antígeno. HAZEN & TAHLER (1953) utilizaram 2 tipos de antígenos: células leveduriformes e extrato de células leveduriformes por trituração. CAMPBELL & BINKLEY (1953) publicaram os resultados obtidos com antígeno, extraído por trituração, de células leveduriformes. FRIEDMAN & CONANT (1953) empregaram 3 tipos de antígenos, a saber: filtrado de cultura da fase miceliana, suspensão de células leveduriformes e purificado protéico, após desintegração das células leveduriformes pelo ultra-som. MARTIN (1953) experimentou sobrenadante e purificados polissacarídicos de células leveduriformes, bem como sobrenadante e purificado protéico e polissacarídico após tratamento das células, por ultra-som. Chegou a conclusão de que o melhor antígeno para fixação do complemento com soros humanos é o líquido sobrenadante total, após o tratamento das células pelo ultra-som. O carboidrato que se difundia rapidamente no sobrenadante das células não tratadas fixava complemento com sôro de coelho imune, mas não com sôro humano. HAZEN & GREENE (1956) experimentaram células leveduriformes e extrato salino de células leveduriformes lavadas e sêcas em acetona.

Na reação de precipitação, CAMPBELL & BINKLEY (1953) empregaram o filtrado de cultura de *B. dermatitidis*, a que chamaram blastomicetina. MARTIN (1953) referiu ter experimentado, nas provas de precipitação, extratos de células tratadas pelo ultra-som, extrato de células não tratadas e várias frações desses materiais. Tôdas se revelaram bons antígenos nas provas de precipitação, mas a fração precipitada ao nível de concentração alcoólica de 45% dava maior quantidade de precipitado comparativamente às outras.

A prova de floculação de partículas de colóidio, sensibilizadas pela blastomicetina, foi experimentada por CAMPBELL & BINKLEY (1953).

A prova de aglutinação de hemácias sensibilizadas foi utilizada por MARTIN (1953), que verificou ser o líquido sobrenadante de células não tratadas por ultra-som e a fração desse líquido, precipitada ao nível alcoólico de 73%, bons antígenos para sensibilização de hemácias; a reação, no entanto, era muito sensível e inespecífica, sendo abandonada.

As conclusões a serem tiradas dessa revisão da imunologia da blastomicose norte-americana são as seguintes: não se tem muita certeza sobre o melhor antígeno a ser empregado nas reações intradérmicas. Parece que os polissacarídeos se constituirão em melhores antígenos para este tipo de reação, segundo PECK & colab. (1940) e DYSON & EVANS (1954). No entanto, ainda em trabalhos recentes, encontramos o emprêgo de suspensão de células leveduriformes (HARRIS & colab., 1957). Não verificamos estudos que referissem o tempo de moléstia necessária à positivação da prova intradérmica. O mesmo acontece aos outros tipos de anticorpos. Este fato tem explicação no desconhecimento que ainda existe a respeito das formas iniciais da blastomicose norte-americana. WILSON (1957) referiu que, dos 4 casos de blastomicose cutânea primária, 2 foram submetidos às provas imunológicas e a prova intradérmica logo se tornou positiva, com altas diluições do antígeno. Em 1 dos casos, a reação de fixação do complemento foi negativa e noutro foi positiva, somente em título baixo. Todos os casos evoluíram para a cura.

Supõe-se que a blastomicose norte-americana tenha o mesmo modo de contágio que a histoplasmose e coccidioidomicose, isto é, a partir do cogumelo na natureza, fazendo-se o contágio por inalação da forma infetante do fungo. Esta conclusão é sugerida por HARRIS & colab. (1957), que realizaram inquérito epidemiológico no Estado de Carolina do Norte, através de reações intradérmicas e de fixação do complemento. Encontraram numa área, em que ocorrera pequena epidemia de blastomicose, 2,9% de reatores à prova intradérmica.

Os mapas de distribuição da moléstia são, no entanto, organizados ainda pela ocorrência de casos de blastomicose, como no trabalho de SCHWARZ & FURCOLOW (1955), no qual sugeriram também que as 3 infecções — histoplasmose, coccidioidomicose e blastomicose são adquiridas na natureza, por inalação e não se transmitem de homem a homem. Referiram, ainda, que as reações intradérmicas na blastomicose não são tão constantes como nas outras duas infecções, isto devido à falta de antígeno satisfatório ou à baixa capa-

cidade de produção de anticorpos pelo *B. dermatitidis*. Clinicamente, a maioria dos casos nas 3 infecções são assintomáticos e reveláveis pela prova intradérmica, que se torna positiva em 4-6 semanas. Sinais radiológicos são comuns na histoplasmose, menos comuns na coccidioidomicose e não foram vistos na blastomicose. Manifestações clínicas são evidentes na coccidioidomicose, demonstradas na histoplasmose e ainda não referidas na blastomicose.

MARTIN (1953), que indiscutivelmente tem grande experiência com a prova de fixação de complemento na blastomicose norte-americana, chega às seguintes conclusões: existe na superfície das células da fase leveduriforme do *B. dermatitidis*, polissacarídeo antigênicamente ativo e que se difunde rapidamente no líquido, quando as células são suspensas em salina. Este polissacarídeo fixa complemento só em presença de sêro de coelho, mas não em presença do sêro humano. Conclui, então, que a fixação do complemento com sêro humano é medida de anticorpos contra proteínas do cogumelo e, como eles aumentam com o progredir da moléstia, não têm função na cura da mesma. Já os anticorpos anti-carboidratos indicariam resistência do organismo. Registrou que, nos casos em que a fixação do complemento se mostrava positiva em altos títulos e a prova de hemaglutinação de título baixo, o prognóstico era mau. Nos casos contrários, com hemaglutinação positiva em altos títulos e a fixação em títulos baixos, o prognóstico era bom. Neste trabalho, em 69 casos comprovados de blastomicose, obteve 29% de reações de fixação do complemento negativas, empregando, como antígeno, extrato de células leveduriformes tratadas pelo ultra-som. Referiu que êstes resultados estão de acôrdo com sua experiência anterior, empregando células leveduriformes como antígeno.

SMITH (1949) publicou as conclusões do estudo imunológico de 40 casos de blastomicose, classificando-os em 4 grupos, por critério imunológico:

1) *Reação intradérmica positiva. Reação de fixação do complemento negativa.* Pacientes geralmente com lesões cutâneas localizadas, ou de formas pulmonares recentes. Prognóstico bom. Evolução boa em 9 casos, morte em 1.

2) *Prova intradérmica positiva. Fixação do complemento positiva.* Neste grupo há casos de boa evolução, em que os anticorpos fixadores do complemento vão desaparecendo com a melhora do paciente. Três mortes em um grupo de 10.

3) *Prova intradérmica negativa. Fixação do complemento positiva.* Geralmente, formas generalizadas, com mau prognóstico. Oito mortes em um grupo de 10.

4) *Prova intradérmica negativa. Fixação do complemento negativa.* Neste grupo referiu alguns casos em fase final, em anergia e casos recentes que ainda não desenvolveram anticorpos. Em 1 caso foi demonstrado excesso de antígeno circulante, com prova cutânea positiva por sôro imune.

Convém assinalar que o critério adotado pelo Autor foi exclusivamente o imunológico porque, pelo quadro dos resultados, podemos verificar que as manifestações clínicas não são levadas em consideração, havendo, por exemplo, formas disseminadas em todos os grupos. SCHWARZ & BAUM (1952) pesquisaram a possibilidade de contágio da blastomicose nos contactantes domiciliares e hospitalares de 12 pacientes. Adotaram como critérios: a) pesquisa da moléstia no contactante; b) evidências indiretas: história, reações intradérmicas e provas sorológicas. Empregaram, como antígeno, células leveduriformes mortas pelo calor. Não encontraram reações positivas em 48 contactantes domiciliares e em 58 contactantes hospitalares. Chegaram à conclusão de que o *B. dermatitidis* deve ser de baixa contagiosidade.

*O problema das reações cruzadas* — Complementando a revisão bibliográfica das três micoses profundas mais importantes na América do Norte, resta-nos referir os estudos realizados quanto à especificidade dos antígenos empregados nas várias provas imunológicas. Hoje sabemos que, para a maioria das reações empregadas no estudo imunológico dessas micoses, provas cruzadas se verificam em maior ou menor intensidade, chegando muitos AA. a preconizar que as reações imunológicas sejam feitas ao mesmo tempo com antígenos do *Coccidioides immitis*, do *Histoplasma capsulatum* e do *Blastomyces dermatitidis*, quando se pretende esclarecer a qual dêles é devida a infecção atual.

MARTIN (1935) já referia que, pela prova de fixação do complemento, dois soros de pacientes de blastomicose com anticorpos anti-*Blastomyces* não revelaram anticorpos anti-*Sporotrichum*, anti-*Coccidioides*, anti-*Histoplasma*, anti-*Geotrichum*, anti-*Monilia albicans* e anti-*Monilia candida*.

EMMONS & colab. (1945) se preocuparam com as reações cruzadas em provas intradérmicas, verificando que a diluição a 1/1.000 da histoplasmina dava reações positivas em cobaios experimental-

mente infetados com histoplasmose, blastomicose, coccidioomicose e haplomicose. Trinta e quatro de 136 pessoas hospitalizadas reagiram positivamente à histoplasmina e à blastomicetina. SALVIN (1947) referiu que, empregando células leveduriformes de *H. capsulatum* mortas pelo formol, não obteve reações cruzadas com 8 soros de coelhos e 10 soros humanos de coccidioomicose, 8 soros de coelhos de blastomicose e 4 soros de coelhos de monilíase, em prova de fixação do complemento. SASLAW & CAMPBELL (1948) verificaram pela prova de floculação de partículas de colódio que, quando as mesmas eram sensibilizadas com histoplasmina, soros anti-*Blastomyces dermatitidis* reagiam em fracas diluições, enquanto que soros anti-*Paracoccidioides brasiliensis*, *Sporotrichum schencki*, *Cryptococcus neoformans* e *Candida albicans* não reagiram. CROSS & HOWELL (1948) isolaram da histoplasmina polissacarídeo que dava reações positivas quando injetado intradèrmicamente, tanto em cobaios infetados por *H. capsulatum*, como naqueles infetados por *B. dermatitidis*. Sugeriram, no entanto, que a padronização do antígeno poderia torná-lo específico. PATES (1948) purificou, a partir de histoplasmina, fração polissacarídica que se demonstrou mais específica pela reação intradèrmica em coelhos experimentalmente inoculados com blastomicose.

SASLAW & CAMPBELL (1948), empregando como antígeno células leveduriformes de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis* e *C. albicans* e soros hiperimunes de coelhos, demonstraram que: a) soros anti-*C. albicans*, *Sp. schencki* e *C. neoformans* davam reações negativas com antígeno de *H. capsulatum*, enquanto que soro anti-*B. dermatitidis* dava reação cruzada em título baixo; b) o antígeno *B. dermatitidis* tem baixa capacidade imunogênica em coelhos, produzindo soro com título de 1/40 no máximo. Três antígenos de *H. capsulatum* forneceram títulos de 1/80, 1/80 e 1/120 para o mesmo soro. Repetiram as experiências de SALVIN, mas continuaram a encontrar as reações cruzadas. CAMPBELL & SASLAW (1948), utilizando como antígeno extrato obtido por trituração de células leveduriformes, demonstraram ainda, por provas de fixação do complemento, reações cruzadas entre *Histoplasma* e *Blastomyces*, enquanto que soros anti-*B. brasiliensis*, anti-*Sp. schencki* e anti-*C. albicans* não reagiam com antígeno de *Histoplasma capsulatum*.

SALVIN (1949), fazendo absorção de soros de coelhos experimentalmente infetados e provas de fixação do complemento, demonstrou que o *B. dermatitidis* é o antígeno menos específico, mas quando injetado produz o anticorpo mais específico. O seu anti-

sôro reagiu com o antígeno específico e em menor grau com o *H. capsulatum* e foi absorvido pelo *H. capsulatum* e em menor grau pela *C. albicans* e *C. immitis*. O *H. capsulatum* produziu sôro que reagia igualmente com o antígeno homólogo e com *B. dermatitidis*, e que era absorvido por êste último antígeno e em menor grau por *C. albicans* e *C. immitis*. Êstes dois últimos antígenos produziram soros que reagiam em provas de fixação do complemento, sendo absorvidos com os outros 3 antígenos heterólogos. Os antígenos nas provas de fixação do complemento eram células leveduriformes de *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. albicans* e coccidioidina. Em 1949, CAMPBELL & SASLAW, em 5 soros de histoplasmose, verificaram que três fixavam o complemento em títulos menores que com o antígeno homólogo, quando se usava como antígeno *B. dermatitidis*. Duas amostras de casos de blastomicose, com títulos de 1/10, não fixavam o complemento com antígeno de *H. capsulatum*. SALVIN (1950) estudou as relações antigênicas de *Aspergillus fumigatus*, *Blastomyces dermatitidis*, *Candida albicans*, *Candida stellatoidea*, *Cryptococcus neoformans* e *Histoplasma capsulatum*. Com provas de fixação do complemento e ainda absorção e titulação do "nitrogênio-anticorpo", chegou às seguintes conclusões:

- a) Reação positiva com *B. dermatitidis* pode indicar infecção por *B. dermatitidis*, *H. capsulatum*, *C. albicans*, *C. neoformans* ou *C. immitis*.
- b) Reação positiva com *H. capsulatum* pode indicar infecção por *H. capsulatum*, *B. dermatitidis*, *C. immitis* ou *C. albicans*.
- c) Reação positiva com *C. albicans* pode indicar infecção por outras espécies de *Candida*, *C. neoformans*, *B. dermatitidis* ou *H. capsulatum*.

As reações cruzadas acima foram determinadas quantitativamente somente em coelhos hiperimunes. Os antígenos eram células leveduriformes. O grau de reações cruzadas com soros humanos não é necessariamente o mesmo.

CAMPBELL & BINKLEY (1953) referiram: a) reações cruzadas em casos de histoplasmose; assim, soros de doentes de histoplasmose podem fixar o complemento com o mesmo título com antígeno de *B. dermatitidis*, o mesmo não acontecendo com a coccidioidina; b) reações cruzadas em casos de blastomicose; os soros de doentes de blastomicose reagem com antígeno de *H. capsulatum*, mas não com a coccidioidina; c) reações cruzadas em casos de coccidioidomicose;

os soros de doentes de coccidioomicose reagem com antígeno de *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*. Assinalaram, ainda, que a técnica e o antígeno empregados não influem nas reações cruzadas. Fizeram experiência com provas de fixação do complemento, empregando 4 tipos de antígenos: células leveduriformes do *Histoplasma capsulatum*; extrato do *Histoplasma capsulatum*; extrato do *Blastomyces dermatitidis* e coccidioidina. Verificaram, ainda, reações cruzadas com as provas de partículas de colódio sensibilizadas e nas de precipitação. FRIEDMAN & CONANT (1953) mostraram reações cruzadas entre *B. dermatitidis* e *P. brasiliensis*, utilizando provas intradérmicas em cobaios experimentalmente infetados e também em alguns casos de blastomicose norte-americana. Os antígenos utilizados foram paracoccidioidina e blastomicetina-filtrado e também células leveduriformes. FRIEDMAN & CONANT (1953) estudaram as reações cruzadas entre *P. brasiliensis* e *B. dermatitidis*, efetuando provas de fixação do complemento, com 3 tipos de antígenos. Em soros de coelhos, as reações cruzadas foram mais frequentes. Em 20 casos de blastomicose norte-americana, 11 reagiram com o antígeno homólogo e 2 com o antígeno heterólogo. Em 11 casos de blastomicose sul-americana, 5 reagiram com um ou outro tipo do antígeno heterólogo. Nem todos os casos que apresentavam altos títulos com o antígeno homólogo reagiram com o antígeno heterólogo. MARTIN (1953) mostrou também reações cruzadas com soros de blastomicose e antígeno de *H. capsulatum*, obtido por tratamento das células leveduriformes por ultra-som. No mesmo trabalho, o Autor refere as provas cruzadas em reações intradérmica com cobaios infetados por *H. capsulatum* e *B. dermatitidis*. SALVIN & FURCOLOW (1954) registraram reações cruzadas em casos de histoplasmose com antígenos de *B. dermatitidis* e de *C. immitis*, em provas de precipitação.

LABZOFFSKY & colab. (1957) isolaram 3 frações, entre 8 obtidas do *H. capsulatum*, que se mostraram específicas na reação de fixação do complemento.

*Blastomicose sul-americana* — Duas provas imunológicas têm sido estudadas na blastomicose sul-americana: a intradérmica e a fixação do complemento.

O estudo da prova intradérmica teve início com FONSECA FILHO & ARÊA LEÃO (1927), que a realizaram em dois pacientes, com filtrado de cultura do *P. brasiliensis*, em caldo (pH — 7,4) curante 6 meses, à temperatura ambiente, sendo que ambos os doentes reagiram positivamente. BASGAL (1931), com antígeno semelhante, obteve resultados positivos em 6 casos de blastomicose.

ALMEIDA & LACAZ (1941; 1942) empregaram, como antígeno, filtrado de cultura em Sabouraud-líquido de 19 amostras de *P. brasiliensis*. ALMEIDA & colab. (1945) chamaram Paracoccidioidina I ao antígeno idêntico ao anterior e com o qual realizaram provas intradérmicas em 22 doentes de blastomicose, obtendo 19 reações positivas; Paracoccidioidina II, suspensões da fase leveduriforme, do *P. brasiliensis*, a 1/10 e a 5% em solução salina fenicada e mortas pelo calor a 80°C, 1/2 hora, três dias consecutivos. Com este antígeno, realizaram provas em 22 pacientes com a suspensão a 1/10, obtendo 18 reações positivas e em 16 com suspensão a 5%, verificando 10 provas positivas; Paracoccidioidina III, pus ganglionar a 1/10 aquecido a 70°C, 1/2 hora, três dias sucessivos. Com este antígeno realizaram provas intradérmicas em 18 pacientes, com 9 resultados positivos. LACAZ (1945), referindo-se às experiências anteriores, salienta que o antígeno mais satisfatório foi a Paracoccidioidina I. SILVA (1945) experimentou, como antígeno, pus de testículo de cobaio experimentalmente infetado, rico em parasitas, diluído a 1/15 e aquecido a 75°C, 1 hora, três dias consecutivos. As reações intradérmicas foram positivas nos 8 casos experimentados. LACAZ (1948) utilizou células leveduriformes mortas pelo calor, de uma única amostra de *P. brasiliensis*. Em 26 pacientes verificou 18 reações positivas e duas duvidosas. LACAZ (1951) referiu o uso de Paracoccidioidina-filtrado, cultura de 10 amostras de *P. brasiliensis* em meio de SMITH. Verificou, com este antígeno, 10 reações positivas em 18 casos de blastomicose.

MACKINNON & colab. (1953) fizeram estudo experimental para padronização do antígeno a ser empregado em reações intradérmicas. O antígeno estudado foi o filtrado de amostra de *P. brasiliensis* em caldo-peptonado a 1% e glicosado a 2%. Demonstraram que ele era específico quando utilizado na diluição de 1/100. O mesmo antígeno foi empregado por HOUNIE & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE (1957). DEL NEGRO & FARIA (1954) fizeram estudo experimental, empregando células leveduriformes como antígeno. DOUAT & DIAS (1958) utilizaram filtrado após autoclavação de cultura de *P. brasiliensis* em Sabouraud-líquido, em temperatura ambiente, por 30 dias. CARVALHO (1958) usou paracoccidioidina-filtrado, cultura de 13 amostras de *P. brasiliensis* em meio de SMITH e paracoccidioidina-suspensão, células leveduriformes fornecidas pelo Prof. Lacaz.

A prova de fixação do complemento foi estudada desde 1916 quando MOSES empregou, como antígeno, extrato em solução fisiológica do cogumelo desenvolvido em ágar-Sabouraud, durante 6

meses. Obteve 8 reações positivas em 10 doentes estudados. GOMES & ASSUMPTÃO (1924) prepararam antígeno de culturas de 2 meses, triturando o cogumelo em gral, emulsionando-o em solução fisiológica e fervendo 5 minutos. A emulsão, livre dos grumos maiores, era o antígeno que foi empregado em estudo experimental e em 2 casos de blastomicose. FONSECA & ARÊA LEÃO (1927) empregaram como antígeno extrato salino de cultura do cogumelo em gelose, durante 2 meses e também filtrados de culturas do cogumelo em caldo, durante 6 meses. Estudaram a reação em 3 doentes de blastomicose e referiram ser o filtrado antígeno de grande sensibilidade. BASGAL (1931) obteve, com "antígeno-filtrado", 100% de reações positivas em 6 casos estudados. LACAZ (1945; 1949) utilizou filtrado de cultura de 20 amostras de *P. brasiliensis* em Sabouraud-líquido, durante 3 meses à temperatura de 28°C mais ou menos.

FAVA NETTO (1955), após estudar polissacarídeo extraído de células leveduriformes do *P. brasiliensis*, segundo técnica de NORDÉN, filtrado de cultura em meio de SMITH e células leveduriformes em suspensão, padronizou novo processo de preparo de polissacarídeo, por modificação da técnica de NORDÉN. Este antígeno revelou poder fixador bem maior que os outros e foi utilizado em reações de fixação do complemento quantitativas e por técnica de 50% de hemólise.

Dos estudos realizados com a reação intradérmica, chega-se à conclusão de que a referida prova tem valor muito relativo quanto à finalidade diagnóstica, pois, mesmo empregando antígenos não diluídos, não são raros os doentes de blastomicose que não reagem. Realmente, os primeiros pesquisadores se preocuparam com o aspecto diagnóstico do problema e muitos dos acima citados verificaram algumas reações inespecíficas, quando realizaram a prova com antígenos não padronizados, em pacientes de outras entidades mórvidas. Também a possibilidade de se verificarem reações cruzadas com outras micoses profundas foi pesquisada por LACAZ (1948), que demonstrou reações positivas em pacientes de blastomicose sul-americana, quando utilizava blastomicetina como antígeno, não verificando reações cruzadas com a coccidioidina. As reações cruzadas, que se verificam pela prova intradérmica, foram também referidas por MACKINNON & colab. (1953), CARVALHO (1958) e DOUAT & DIAS (1958).

LACAZ (1951), após chamar a atenção para a grande freqüência das lesões pulmonares na blastomicose sul-americana, aventa a hipótese da possível existência de "blastomicose-infecção". Em in-

quérito epidemiológico, que procedeu na ocasião, verificou 7,8% de reatores positivos em pacientes internados no Hospital das Clínicas, por outras causas. MACKINNON & colab. (1953) também realizaram inquérito epidemiológico em pacientes internados nos hospitais de Montevidéo, encontrando 2% de reatores positivos à paracoccidioidina padronizada. CARVALHO (1953) verificou, no Rio de Janeiro, a incidência de 4,2% de reatores à paracoccidioidina a 1/10 e 1,7% à paracoccidioidina a 1/100. DOUAT & DIAS (1958) verificaram 8% de reatores positivos. HOUNIE & ARTAGAVEYTIA-ALLENDE (1957), utilizando paracoccidioidina a 1/10, realizaram inquérito epidemiológico em Montevidéo, observando 30 pessoas com 0% de reatores; em Mercedes, 12 pessoas com 25% de reatores e, em Rio Negro, 12 pessoas com 41,66% de reatores, indicando que, conforme se deslocavam para a zona das matas, maior o número de reatores à paracoccidioidina, entre as pessoas sadias. CARVALHO (1958) não pôde chegar a nenhuma conclusão quanto ao prognóstico da moléstia, empregando a prova intradérmica seriadamente nos pacientes.

Os primeiros trabalhos sôbre fixação do complemento na blastomicose sul-americana permitiram verificar que a maioria dos pacientes reagia positivamente à prova. Conclusões melhores puderam ser alcançadas com o trabalho de LACAZ (1949) e FAVA NETTO (1955), os quais verificaram serem positivas as provas em pacientes com moléstia de certa duração; serem negativas as provas em alguns pacientes graves; poderem acompanhar, pela sorologia, o tratamento dos pacientes; não poderem atribuir valor diagnóstico e prognóstico absoluto a tais provas.

Numerosos problemas existem ainda a ser explorados na imunologia da blastomicose sul-americana. Inclusive, acreditamos não ser possível efetuar corretamente a classificação de formas clínicas da moléstia, a não ser com o estudo conjunto da parte imunológica. É essencial sabermos, com certeza, se existem formas assintomáticas, como os inquéritos epidemiológicos sugerem e formas pulmonares agudas e benignas que passariam despercebidas, com diagnósticos de gripe ou de outras afecções pulmonares agudas. Precisamos procurar, no estudo conjunto das provas imunológicas, dados que talvez nos permitam conclusões quanto ao prognóstico, face a casos de blastomicose.

No presente trabalho trazemos novas contribuições ao estudo imunológico da blastomicose sul-americana. Estudamos, inicialmente, a possibilidade de execução de outras provas sorológicas, tais

como a aglutinação de hemácias de carneiro sensibilizadas, a flocculação de partículas de colesterol sensibilizadas e a reação de precipitação. Somente esta última prova pôde ser introduzida na rotina e então, estudada conjuntamente com as de fixação do complemento. Paralelamente, novos estudos imunológicos foram realizados com o antígeno por nós padronizado. Também incluímos, no presente trabalho, pesquisa quanto à possibilidade de transmissão inter-humana da paracoccidiodomicose, estudando familiares de doentes.

### MATERIAL E MÉTODO

Em virtude de terem sido utilizados, no presente trabalho, alguns métodos já referidos em nossa tese de doutoramento, êles não receberão aqui descrição pormenorizada. Os novos métodos de que nos utilizamos é que serão bem explanados.

Neste capítulo vamos referir pesquisas sôbre o antígeno polisacarídico, que empregamos tanto nas reações de fixação do complemento, como nas de precipitação. São dados que poderiam ser, em parte, incluídos no capítulo de resultados. Serão aqui referidos porque apresentam interêsse que se relaciona mais de perto com o material e método das reações, que com as pesquisas de interêsse clínico que constituirão o capítulo de resultados.

### ANTÍGENOS

*Amostras empregadas. Poder fixador ótimo.* — Preparamos, de acôrdo com técnica própria, já descrita em 1955, 22 partidas do antígeno polissacarídico. No Quadro I, referimos as amostras de *P. brasiliensis* utilizadas, dias de cultivo e poder fixador ótimo para 3 e 6 unidades de complemento (50% de hemólise). O poder fixador ótimo é aquela diluição do antígeno que revela maior título para sôro positivo, com determinada quantidade de complemento. Êle é determinado por titulação cruzada, empregando-se várias diluições de antígeno frente a várias diluições de sôro positivo.

*Poder anticomplementar* — Todos os antígenos por nós preparados, quando utilizados nas diluições ótimas, não apresentaram atividade de anticomplementar.

*Conservação* — O antígeno referido como n.º 3, no Quadro I, foi conservado estêrilmente, em geladeira, sem preservativo, sem perder seu poder fixador e sem adquirir atividade anticomplementar, durante 3 anos.

QUADRO I  
ANTÍGENOS POLISSACARÍDICOS

Parti- da	Amostras de <i>P. brasiliensis</i>	Dias de cultivo	Poder fixador ótimo	
			3 Unidades	6 Unidades
1	104, 395, SN, 18, 128, 265 .....	62	1/50	1/50
2	104, 395, SN, 18, 128, 265 e AS. ....	70	1/100	1/100
3	104, 395, SN, 18, 128, 265 e AS. ....	64	1/100	1/100
4	104, 395, SN, 18, 128, 265 e AS. ....	64	1/100	1/50
5	104, 395, SN, 18, 265 e AS. ....	77	1/100	1/50
6	104, 395, 18, 265, SN e AS. ....	72	1/50	1/25
7	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	49	1/50	1/25
8	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	73	1/100	1/50
9	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	64	1/100	1/50
10	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	71	1/50	1/25
11	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	79	1/100	1/50
12	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	63	1/100	1/50
13	104, 395, 18, 265, SN, SM. e AS. ....	69	1/100	1/50
14	104, 395, 18, 265, SN, SM. e AS. ....	60	1/50	1/25
15	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	70	1/100	1/50
16	104, 395, 265, SN, 18, AS. e SM. ....	74	1/150	1/75
17	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	92	1/50	1/25
18	104, 395, 18, 265, SN, AS. e SM. ....	63	1/100	1/100
19	104, 395, 18, 265, SN, AS, SM. e PTL.	83	1/150	1/75
20	104, 395, 265, 18, SN, SM, AS. e PTL.	64	1/150	1/75
21	104, 395, 265, 18, SN, SM, AS. e PTL.	72	1/100	1/50
22	265, 395, 18, 104, SN, SM, AS. e PTL.	64	1/150	1/150

*Antigenicidade* — Procuramos verificar se o antígeno polissacarídico se comportaria como antígeno completo para o coelho. Para comparação utilizamo-nos também, nesta experiência, de vacina anti-blastomicótica, preparada no Departamento de Microbiologia e Imunologia e constituída de suspensão de células leveduriformes do cogumelo, mortas pelo calor. Um coelho recebeu por via endo-

venosa, com intervalo de 3 dias, polissacarídeo não diluído, nas seguintes quantidades: 0,25 ml, 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml e 1,5 ml. Após 11 dias de repouso, recebeu, ainda por via endovenosa, com intervalo de 5 dias, as seguintes quantidades de polissacarídeo, 1,0 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 1,5 ml e 1,5 ml. Soros obtidos desse coelho, antes do início da imunização, 9 dias após a última injeção da 1.<sup>a</sup> série e 12 dias após a última injeção da 2.<sup>a</sup> série, não mostraram presença de anticorpos anti-polissacarídeo, pelas reações de precipitação e de fixação do complemento. Outro coelho recebeu por injeções intramusculares, com intervalo de 5 dias, as seguintes quantidades de vacina: 0,5 ml, 1,0 ml, 1,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml, 2,0 ml, 2,0 ml, 2,0 ml, 2,0 ml e 2,0 ml. Soros obtidos desse coelho, antes da primeira injeção, 19 e 35 dias após a última injeção, não revelaram a presença de anticorpos pelas reações de precipitação e fixação do complemento.

Julgando que esta primeira tentativa pudesse funcionar como imunidade de base na produção de anticorpos para uma segunda série de injeções de antígeno, administramos por via endovenosa, em ambos os coelhos, com intervalo de 3 dias, as seguintes quantidades de vacina: 1 ml, 2 ml, 3 ml, 4 ml, 5 ml, 5 ml, 5 ml, 5 ml, 5 ml e 5 ml. Soros obtidos de ambos os coelhos aos 13, 22 e 48 dias após as últimas injeções foram negativos pelas reações de precipitação e fixação do complemento. O período de repouso entre a última injeção de polissacarídeo e a primeira da vacina foi, para o 1.<sup>o</sup> coelho, de 15 dias. O período de repouso, entre as injeções intramusculares e as endovenosas de vacina, foi, para o 2.<sup>o</sup> coelho, de 25 dias.

*Antígenos de amostras separados* — Outra pesquisa que realizamos foi com finalidade de verificar se era possível obter antígenos com as mesmas propriedades e com a mesma potência antigênica das 8 amostras que normalmente utilizamos. No Quadro II referimos as amostras, os dias de cultivo e o poder fixador ótimo para 3 e 6 unidades de complemento (50% de hemólise).

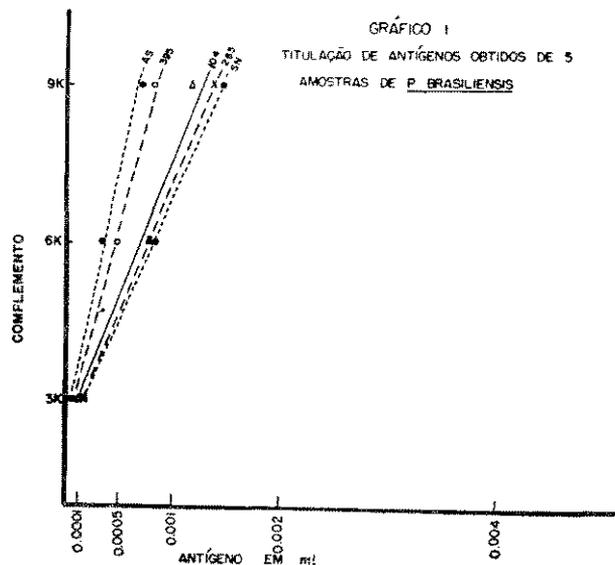
Procuramos também, analisar, por outro método, as potências relativas dos antígenos obtidos de cada amostra. Realizamos, segundo técnica aconselhada por ALMEIDA (1956), curvas de isofixação para 3 e 6 unidades de complemento. Tomamos, então, quantidade de sôro que se situava em posição em que os ramos verticais das curvas eram paralelos entre si, e procedemos à titulação de antígenos obtidos de 5 amostras com 3, 6 e 9 unidades de complemento (50% de hemólise).

QUADRO II  
ANTÍGENOS OBTIDOS DE AMOSTRAS ISOLADAS

Amostras	Dias de cultivo	Poder fixador ótimo	
		3 unidades	6 unidades
PTL	64	1/50	1/50
104	64	1/50	1/25
395	64	1/150	1/75
SN	64	1/100	1/50
265	64	1/150	1/75
AS	64	> 1/150	1/150
18	64	> 1/150	> 1/150
SM	64	1/50	1/25

A inscrição das quantidades de antígeno necessárias para se obter 50% de hemólise, nos tubos reação, quando 3, 6 e 9 unidades de complemento estão inicialmente presentes, dá-nos as retas do gráfico 1 para as 5 amostras de antígeno.

Essas experiências preliminares indicavam diferenças na potência dos antígenos obtidos das várias amostras. Fizemos, então, nova verificação considerando a possibilidade de essa diferença correr por conta da suspensão celular (a 15%), por ser feita em relação ao volume úmido das células. No Quadro III estão referidos os dados



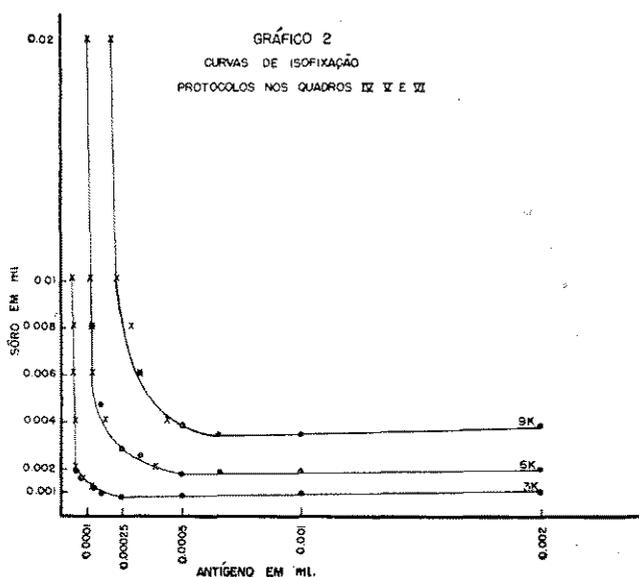
relativos a novo preparo de antígenos separados para cada amostra. A extração do polissacarídeo foi feita a partir de suspensão celular a 15% (de células úmidas), mas antes de se proceder a suspensão, as células foram deixadas secar e pesadas. A percentagem relativa ao peso das células correspondente para cada antígeno também se encontra anotada no quadro III.

## QUADRO III

## ANTÍGENOS OBTIDOS DE AMOSTRAS ISOLADAS

<i>Amostra</i>	<i>Dias de cultivo</i>	<i>Volume úmido e peso das células, depois de secas</i>	<i>Percentagem da suspensão</i>
SN	63	4,5 ml	15%
		2,8 g	9,5%
PTL	56	1,5 ml	15%
		1,0 g	10%
395	56	2,5 ml	15%
		1,0 g	6%
265	63	2,5 ml	15%
		0,5 g	3%
104	63	2,0 ml	15%
		0,5 g	3,75%
18	71	3,0 ml	15%
		1,7 g	8,5%
AS	71	5,0 ml	15%
		4,0 g	12%
SM	71	1,5 ml	15%
		0,4 g	4%

Para empregarmos na titulação dos antígenos quantidade de anticorpo adequada, fizemos curvas de isofixação para 3, 6 e 9 unidades de complemento, com o antígeno da partida 22 e mistura de soros positivos. Os Quadros IV, V e VI nos mostram as quantidades de sêro e de antígeno empregados na obtenção das curvas de isofixação.



A quantidade de sêro necessária para 50% de hemólise, com determinada quantidade de antígeno, foi determinada inscrevendo-se logaritmo das quantidades de sêro contra logitos de hemólise, como aconselham RAPPORT & GRAF (1957). Podemos verificar que, para as maiores quantidades de antígeno, obtemos, para uma mesma quantidade dêste, 2 tubos com hemólises parciais para duas diferentes quantidades de sêro. Quando as quantidades de sêro são grandes, para determinada quantidade obtemos 2 tubos ou mais de hemólises parciais com quantidades diferentes de antígeno. Usamos, então, a inscrição de logaritmo de antígeno contra logito de hemólise, para calcular a quantidade de antígeno necessária a 50% de hemólise com determinada quantidade de sêro.

**QUADRO IV**  
**EXPERIÊNCIAS COM 3 UNIDADES DE COMPLEMENTO**

<i>Antígeno</i>	<i>Soro positivo</i>											
	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002	0,0016	0,0012	0,0008	0,0004	0,00032	0,00024	0,00016
0,002 .....	0	0	0	0	5	10	35	80	85	90	100	100
0,001 .....	0	0	0	0	0	5	20	70	90	100	100	100
0,0005 .....	0	0	0	0	0	10	25	45	85	100	100	100
0,00025 .....	0	0	0	0	5	10	30	40	100	100	100	100
0,00016 .....	0	0	0	0	5	10	30	70	90	100	100	100
0,000125 .....	0	0	0	5	15	20	40	85	90	100	100	100
0,00008 .....	5	10	15	20	25	45	75	85	90	100	100	100
0,0000625 .....	20	20	40	45	35	85	75	100	100	100	100	100
0,00005 .....	20	40	50	60	80	85	85	100	100	100	100	100
0,0000416 .....	50	55	65	75	80	80	85	100	100	100	100	100
0,0000357 .....	55	55	60	85	85	100	100	100	100	100	100	100

QUADRO V  
EXPERIÊNCIAS COM 6 UNIDADES DE COMPLEMENTO

Antígeno	Sêro positivo											
	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002	0,0016	0,0012	0,0008
0,004 .....	0	0	0	0	0	0	0	10	75	100	100	100
0,002 .....	0	0	0	0	0	0	0	0	50	80	100	100
0,001 .....	0	0	0	0	0	0	0	0	30	80	100	100
0,00066 .....	0	0	0	0	0	0	0	10	35	75	80	100
0,0005 .....	0	0	0	0	0	0	0	10	30	60	90	100
0,00033 .....	0	0	0	0	0	10	10	20	65	90	100	100
0,00025 .....	0	0	0	0	10	15	15	30	70	85	100	100
0,00016 .....	25	20	20	20	20	25	35	60	85	100	100	100
0,000125 .....	50	45	50	40	40	50	60	85	100	100	100	100
0,00008 .....	60	60	75	85	80	80	90	100	100	100	100	100
0,0000625 .....	90	100	90	90	100	100	100	100	100	100	100	100
0,00005 .....	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

**QUADRO VI**  
EXPERIÊNCIAS COM 9 UNIDADES DE COMPLEMENTO

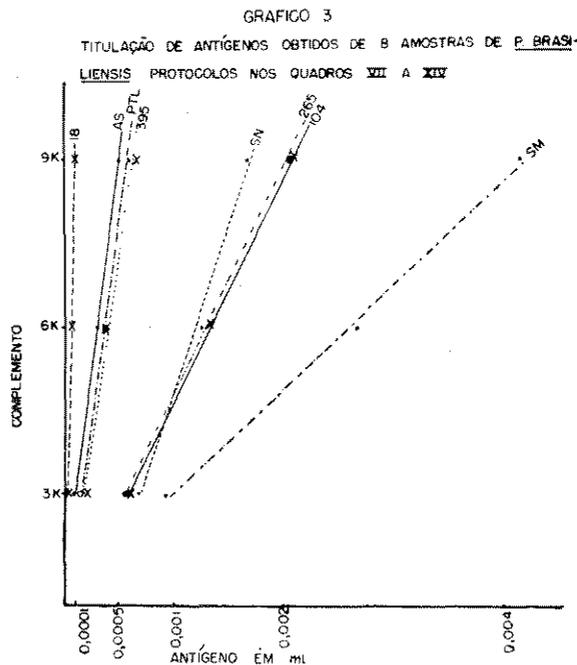
<i>Antígeno</i>	<i>Soro positivo</i>											
	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,008	0,006	0,004	0,002	0,0016	0,0012	0,0008
0,004 .....	0	0	0	0	0	0	15	55	90	100	100	100
0,002 .....	0	0	0	0	0	0	10	45	100	100	100	100
0,001 .....	0	0	0	0	0	5	15	35	90	100	100	100
0,00066 .....	0	0	10	10	15	15	15	40	80	100	100	100
0,0005 .....	0	0	0	0	10	10	20	45	90	100	100	100
0,00033 .....	20	15	35	20	35	35	50	60	100	100	100	100
0,00025 .....	70	50	50	75	85	90	100	100	100	100	100	100
0,00016 .....	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0,000125 .....	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

A inscrição das quantidades recíprocas de anticorpo e antígeno capazes de dar 50% de hemólise com 3, 6 e 9 unidades de complemento fornece-nos as curvas de isofixação representadas no gráfico 2.

Do ramo vertical das curvas podemos escolher quantidade de anticorpo capaz de revelar quantidade mínima de antígeno com 3, 6 e 9 unidades de complemento. Havendo nestas condições excesso de anticorpo, a fixação maior ou menor do complemento dependerá somente da maior ou menor quantidade de antígeno presente. Com tal excesso de anticorpo, titulamos os antígenos preparados, a partir das 8 amostras de *P. brasiliensis* com 3, 6 e 9 unidades de complemento. Os quadros VII a XIV nos dão os resultados de tais titulações. Com estes resultados calculamos as quantidades de antígeno necessárias para 50% de hemólise, inscrevendo em gráfico logaritmo de antígeno contra logito de hemólise, segundo RAPPORT & GRAF (1957).

A inscrição das quantidades de antígenos necessárias para 50% de hemólise, quando 3, 6 e 9 unidades de complemento estão inicialmente presentes, dá-nos o gráfico 3 em que estão representadas as 8 amostras tituladas. Pode-se

fácilmente verificar que há diferenças evidentes na potência dos antígenos obtidos de algumas amostras e, comparando-se os resultados com os do Quadro III, verifica-se que estas diferenças não têm explicação no pêso das células tomado como referência para o preparo da suspensão a ser autoclavada.



QUADRO VII  
TITULAÇÃO DO ANTIGENO SN

	<i>Antigeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	10	55	85	90	100	100
6 K	0	5	50	85	100	100	100	100
9 K	5	20	75	100	100	100	100	100
A <sub>1</sub> **	0	50	65	65	65	50	65	65
A <sub>2</sub> **	90	100	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO VIII  
TITULAÇÃO DO ANTIGENO 104

	<i>Antigeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	10	45	85	100	100	100
6 K	0	10	55	90	100	100	100	100
9 K	10	30	85	100	100	100	100	100
A <sub>1</sub> **	55	65	70	70	70	70	70	70
A <sub>2</sub> **	100	100	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO IX  
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO 395

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	5	20	65	85	100
6 K	0	5	10	35	55	90	100	100
9 K	5	10	15	50	85	100	100	100
A <sub>1</sub> **	30	55	70	60	65	65	65	75
A <sub>2</sub> **	100	100	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO X  
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO AS

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	0	10	30	60	90
6 K	0	0	5	15	50	100	100	100
9 K	0	5	10	30	85	100	100	100
A <sub>1</sub> **	0	0	55	65	65	65	65	65
A <sub>2</sub> **	0	85	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XI  
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO 265

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	5	20	40	80	100	100	100
6 K	5	15	65	90	100	100	100	100
9 K	10	35	85	100	100	100	100	100
A <sub>1</sub> **	0	5	65	60	65	65	65	70
A <sub>2</sub> **	10	85	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XII  
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO 18

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	0	0	0	10	35
6 K	10	5	0	0	0	15	40	90
9 K	15	10	10	5	15	30	65	90
A <sub>1</sub> **	5	60	70	70	70	65	70	70
A <sub>2</sub> **	85	100	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XIII  
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO PTL

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	0	0	0	5	15	45	85	100
6 K	0	0	5	15	65	85	100	100
9 K	0	5	15	40	90	100	100	100
A <sub>1</sub> **	5	45	65	65	65	70	70	60
A <sub>2</sub> **	85	100	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

QUADRO XIV  
TITULAÇÃO DO ANTÍGENO SM

	<i>Antígeno</i>							
	0,005	0,0025	0,00125	0,000625	0,000312	0,000156	0,000078	0,000039
3 K *	5	20	40	65	85	100	100	100
6 K	20	55	80	90	100	100	100	100
9 K	40	80	100	100	100	100	100	100
A <sub>1</sub> **	0	50	65	65	65	65	65	70
A <sub>2</sub> **	85	100	100	100	100	100	100	100

\* K = Unidade (50% de hemólise) de complemento

\*\* A<sub>1</sub> = Testemunho do antígeno com 1 unidade de complemento

\*\* A<sub>2</sub> = Testemunho do antígeno com 2 unidades de complemento

NOTA: Na titulação dos antígenos de amostras separadas, os outros testemunhos incluídos revelaram os seguintes resultados.

Testemunhos do soro { 1 unidade = 35%  
2 unidades = 85%

Testemunhos do complemento { 1 unidade = 65%  
2 unidades = 100%

Testemunho do sistema hemolítico = 0%

As oito amostras de antígenos foram também experimentadas em reação de precipitação com sêro fortemente positivo para precipitinas. Os resultados estão no Quadro XV.

### QUADRO XV

REAÇÕES DE PRECIPITAÇÃO COM 8 ANTÍGENOS DE AMOSTRAS DIFERENTES E SÊRO POSITIVO, NÃO DILUÍDO

Amostras	Diluições dos antígenos		
	1/5	1/15	1/45
395 .....	++++	+++	+++
18 .....	++	+++	+++
265 .....	++++	++++	+++
A.S. ....	++++	++++	++++
S.N. ....	+++	++	+
S.M. ....	++	+++	+++
104 .....	+++	+	+
P.T.L. ....	+++	++	+++

Verificamos pelo Quadro XV que tôdas as amostras liberaram polissacarídeos que funcionaram como antígeno nas reações de precipitação com sêro positivo.

### REAÇÕES DE FIXAÇÃO DO COMPLEMENTO

No presente estudo, referimos resultados obtidos em reações de fixação do complemento, empregando duas técnicas, a de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER (1947) e a de STEIN & VAN NGU (1950). Em nossa tese de doutoramento (1955), estudamos a padronização do antígeno, para seu emprêgo em ambas as técnicas e referimos a modificação da técnica de STEIN & VAN NGU por nós utilizada. Concluimos, naquela ocasião, que o emprêgo simultâneo das duas técnicas era realmente interessante, porque, além de per-

mitir a comparação dos resultados para um mesmo soro, a técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER (1947) se revelou mais sensível, enquanto que a de STEIN & VAN NGU (1950) foi mais específica.

Em nosso trabalho anterior, explicamos a padronização dos elementos das reações de fixação do complemento e não voltaremos a fazê-lo aqui. Para facilitar ao leitor, descreveremos resumidamente os dados fundamentais referentes aos elementos da reação e às técnicas que utilizamos.

- A) *Hemácias de carneiro* — Suspensão a 5% padronizada em colorímetro fotoelétrico (Evans electroselenium) em densidade óptica igual a 0,54 ou 0,56, quando se lisa 0,1 ml da suspensão em 0,9 ml de água destilada. Foi usada sempre mistura de hemácias de dois carneiros.
- B) *Soro hemolítico* — Soro de coelho anti-hemácias de carneiro, padronizado de tal modo que a sensibilização das hemácias era ótima para a dose empregada.
- C) *Complemento* — Mistura de soros de 15-20 cobaios, titulado em unidades 50% de hemólise.
- D) *Solução fisiológica* tamponada com Veronal e contendo cálcio, magnésio e gelatina.
- E) *Antígeno* — Polissacarídeo obtido de várias amostras de *P. brasiliensis* e titulado de acordo com o que já foi exposto em nossa tese de doutoramento (1955).
- F) *Soros* — Colhidos e mantidos estérilmente a -25°C até o momento do uso, quando eram inativados a 56°C, 1/2 hora.

Segundo referimos em nossa tese de doutoramento (1955), os elementos da reação de fixação do complemento, com exceção do antígeno, foram padronizados do mesmo modo, para o emprego nas duas técnicas de que nos utilizamos.

Também os volumes dos reagentes e os períodos de incubação foram os mesmos e, pela ordem em que são distribuídos, são os seguintes:

Soro .....	0,05 ml
Antígeno .....	0,10 ml
Complemento .....	0,10 ml
Solução fisiológica .....	0,05 ml

Incubação a 2-4°C, durante 18 horas.

Sistema hemolítico ..... 0,2 ml

Incubação em banho-maria a 37°C, durante 15 minutos.

Solução fisiológica gelada — 0,5 ml

Agitação. Centrifugação. Leitura da densidade óptica do sobrenadante em colorímetro.

Finalmente, queremos chamar a atenção para o fato de só termos feito o cálculo do título aproximado dos soros, pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e, ainda, para o fato de, por esta técnica, o título ser dado para 0,05 ml de sôro, enquanto que os títulos, pela técnica de STEIN & VAN NGU, representam o número de unidades de complemento (50% de hemólise) fixadas por 1 ml de sôro. Como trabalhamos com volume de 0,05 ml na execução da reação, os eventuais erros ficam multiplicados por 20 nos resultados.

### REAÇÃO DE PRECIPITAÇÃO

Na padronização da reação de precipitação, baseamos-nos principalmente no trabalho de SMITH & colab. (1950). Apoiados na indiscutível experiência dêsses AA., é que passamos a executar a reação nos moldes em que será exposta.

*Antígeno* — Polissacarídeo obtido de várias amostras de *P. brasiliensis*, segundo técnica já publicada por FAVA NETTO (1955). Não experimentamos outros antígenos, pois, segundo SMITH & colab. (1950), a parte polissacarídica da coccidicidina funciona como bom antígeno em provas de precipitação e mesmo o polissacarídeo purificado de HASSID & colab. (1943) se comportou como bom antígeno. Também a experiência de NORDÉN (1951), com antígenos obtidos de *Sp. schencki*, demonstrava que os polissacarídeos funcionam bem em provas de precipitação. Seguindo NORDÉN (1951), fizemos tentativa para verificação da diluição ótima do antígeno, realizando provas cruzadas. Verificamos que o sôro, quando diluído, perde rapidamente a sua capacidade precipitante e que uma mesma diluição do sôro dá prova positiva com diluições numerosas do antígeno. A escolha de uma das diluições do antígeno seria, então, arbitrária. As diluições, que empregamos na realização da prova, foram baseadas na experiência de SMITH & colab. (1950). Sabe-

mos que as provas de precipitação, em sua aplicação clínica, são simplesmente qualitativas e, o que realmente importa, é usar várias diluições do antígeno, para evitar reações falsamente negativas por excesso de antígeno.

*Soros* — Separados estérilmente e usados, quase sempre, logo após a sua separação. Alguns foram conservados em geladeira por 1 ou 2 dias antes do uso e outros usados após terem sido congelados a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Evitamos sempre o seu congelamento, pois os soros de pacientes de blastomicose após serem congelados apresentam, às vezes, auto-precipitação, o que torna inexequível a prova. Antes do uso, os soros foram inativados a  $56^{\circ}\text{C}$ , durante 1/2 hora.

*Solução fisiológica* — Como diluente dos elementos, utilizamos solução de cloreto de sódio quimicamente puro a 0,85% e mertiolatada a 1/5.000.

*Tubos de ensaio* — Empregamos tubos de 10 x 75 mm ou 10 x 100 mm.

*Técnica da reação* — Para cada prova utilizávamos 5 tubos de ensaio. Todos recebiam 0,2 ml de soro não diluído. Os quatro primeiros recebiam a seguir, 0,2 ml das diluições do antígeno, a 1/5, 1/15, 1/45 e 1/135. O último tubo recebia 0,2 ml da solução fisiológica mertiolatada. O 5.º tubo servia, portanto, como testemunho do soro. Em cada dia de execução da prova, incluíamos série de 4 tubos, que recebiam, respectivamente, 0,2 ml das diluições do antígeno e 0,2 ml de solução fisiológica mertiolatada. Eram os testemunhos das diluições do antígeno.

A seguir, os tubos eram agitados e colocados em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 2 horas. Agitados novamente e colocados em geladeira ( $2-4^{\circ}\text{C}$ ), durante 48 horas. A leitura se fez pela verificação de depósito precipitado no fundo do tubo e também com leves batidas no fundo do tubo para suspender o precipitado. A leitura deve ser feita contra a luz da janela e com fundo escuro. Os testemunhos do antígeno e do soro não devem apresentar qualquer precipitado.

Quando iniciamos a realização das reações de precipitação, utilizávamos além do soro puro, uma série de tubos com soro diluído a 1/2. A inclusão dessa série, no entanto, não apresentava interesse prático e a abandonamos. Também tentamos fazer a verifi-

cação do aparecimento de anel de precipitação pela superposição cuidadosa de 0,2 ml de antígeno, nas suas várias diluições, sobre 0,2 ml de sêro não diluído. O anel de precipitação se formava somente em alguns soros e não apresentava correspondência com o precipitado que se verificava após 48 horas de geladeira. Esse processo de leitura também foi abandonado. Finalmente queremos ressaltar que o critério para referir grau de intensidade da reação em cada tubo foi puramente individual, motivo pelo qual tivemos de ler pessoalmente tôdas as reações realizadas. Frequentemente nos defrontamos com soros que revelaram quantidade de precipitado muito maior daquele que convenciamos referir como 4 cruces e que assim foram anotados, por ser a reação máxima que resolvemos conferir.

Com as diluições de antígenos por nós utilizadas, raramente notamos fenômenos de zona, isto é, inibição da reação por excesso de antígeno.

Não empregamos antígeno não diluído, como fizeram SMITH & colab. (1950), porque notamos em várias tentativas que, no testemunho do antígeno não diluído, formava-se pequeno depósito pulverulento e pretendíamos referir, como o fizemos, reações fracas de 1 a 2 cruces de precipitação.

## RESULTADOS

Do início de nossos estudos em 1953, a março de 1959, observamos, no Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 314 pacientes de blastomicose sul-americana. Até novembro de 1955 realizamos somente reações de fixação do complemento; 83 casos foram estudados só por êste método e não serão aqui referidos. Objeto dêste capítulo são os resultados obtidos pela realização simultânea das reações de fixação do complemento e de precipitação em 220 casos de blastomicose sul-americana, bem como as observações feitas em 11 casos especiais, que serão referidos separadamente e ainda estudos imunológicos realizados em familiares de pacientes de blastomicose.

Já assinalamos em nossa tese de doutoramento que o estudo imunológico dos pacientes de blastomicose sul-americana é de primordial interêsse para o seguimento dos pacientes, na verificação da queda do teor de anticorpos no sêro e mesmo na verificação da cura sorológica, ao lado da cura clínica. É natural, portanto, que tenhamos resultados de exames de numerosas amostras de sêro de

um mesmo paciente. Julgamos desnecessário apresentar, neste trabalho, os resultados obtidos em todos os soros por nós examinados. As conclusões que o estudo evolutivo permite poderão ser obtidas da apresentação de grupos selecionados de casos representativos. Esta exposição será feita, no entanto, após a análise dos resultados verificados nos 220 pacientes em conjunto.

Para cada paciente que observamos, fizemos ficha da qual constam, além dos dados de identificação, o tempo de duração da moléstia ao se obter o primeiro soro para exames (pelas reações de fixação do complemento de precipitação) e a observação clínica (por anamnese, exame físico e exames subsidiários) dos tipos de lesões apresentadas. É muito importante salientar que há heterogeneidade acentuada nas observações, pois que a maioria dos pacientes, sendo do Hospital das Clínicas, possui dados mais seguros no que diz respeito à extensão das lesões, enquanto que, em outros pacientes, os dados foram obtidos pela anamnese e exame físico sumário em observação ambulatoria no Departamento de Microbiologia e Imunologia e em outros Serviços.

Na análise conjunta dos resultados, no entanto, baseamos-nos nas informações de ordem clínica para assim pormos à prova os dados imunológicos por nós obtidos.

Baseando-nos nas informações de ordem clínica, conseguimos separar os pacientes em 3 grupos distintos, tomando como referência a condição por eles apresentada quando examinamos os seus soros, pelas provas de fixação do complemento e de precipitação, pela primeira vez.

*Grupo A* — Pacientes com lesões localizadas, sem repercussão ganglionar evidente. Incluimos aqui, também, alguns casos raros de lesões localizadas, como abscesso da região íleo-psoas que, apesar de serem metastáticas, comportaram-se como lesões únicas, sem evidência de outras localizações no mesmo paciente.

*Grupo B* — Pacientes classificados como de forma disseminada da moléstia, por apresentarem mais que um tipo de lesão (mucosa da boca e pulmão; mucosa e ganglionar; cutânea e ganglionar) ou formas declaradamente generalizadas.

*Grupo C* — Pacientes que, quando foram submetidos ao primeiro exame sorológico, já se apresentavam clinicamente curados.

Para análise dos resultados imunológicos obtidos no estudo dos 3 grupos de pacientes, organizamos os Quadros XVI a XX, onde a 1.<sup>a</sup> coluna refere a duração da moléstia antes do primeiro exame e as colunas seguintes, pela ordem, o número de casos em cada grupo; o número de reações de precipitação positivas; o número de reações de fixação do complemento positivas; o título mínimo de anticorpos fixadores do complemento, obtido dentro do grupo, pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER; o título máximo em anticorpos fixadores do complemento pela mesma técnica e finalmente, na última coluna, a média dos títulos obtida pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER. Podemos verificar que, para cada grupo, existem dois quadros separados, de acôrdo com a duração da moléstia até 11 meses e 1 ano ou mais. Faz exceção o grupo C, em que os pacientes, quando observados pela primeira vez, já apresentavam a moléstia há mais de 11 meses. Na última linha temos os totais de cada quadro: na 2.<sup>a</sup> coluna o total de casos, em seguida o total de reações de precipitação positivas e a percentagem de positividade dentro do grupo; depois, o total de reações de fixação do complemento positivas e a respectiva percentagem de positividade. Finalmente, na última subdivisão de cada quadro, apresentamos o cálculo da média geral, para o grupo, do teor de anticorpos (título médio geral).

Os Quadros XVI e XVII apresentam os resultados obtidos em 22 pacientes que foram classificados clinicamente como formas localizadas da moléstia. Verificamos que, nos pacientes cuja moléstia apresentava evolução de menos de 1 ano, obtivemos 100% de resultados positivos pela reação de precipitação e somente 66,6% de resultados positivos pela reação de fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER. Nos pacientes cuja duração da moléstia era de 1 ano ou mais, obtivemos 40% de positividade na reação de precipitação e a positividade da reação de fixação do complemento aumentou para 80%. O título médio geral de anticorpos fixadores do complemento nestes grupos é bem maior para aqueles pacientes cuja moléstia apresentava duração de menos de 1 ano.

**QUADRO XVI**  
**FORMAS LOCALIZADAS**

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 mês .....	1	1	1	26	26	26
4 meses .....	1	1	—	—	—	—
6 meses .....	2	2	1	—	50	25
8 meses .....	2	2	2	3,6	14	9
9 meses .....	4	4	3	2	18	7
10 meses .....	2	2	1	—	51	25
Total .....	12	12 (100%)	8 (66,6%)			Título médio geral 14,6

**QUADRO XVII**  
**FORMAS LOCALIZADAS**

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 ano .....	3	2	3	9,5	13	11
2 anos .....	2	—	2	5,2	7	6
4 anos .....	2	—	1	—	2	1
5 anos .....	1	1	—	—	—	—
6 anos .....	1	1	1	6	6	6
10 anos .....	1	—	1	2,5	2,5	2,5
Total .....	10	4 (40%)	8 (80%)			Título médio geral 5,8

Os Quadros XVIII e XIX mostram os resultados obtidos em pacientes que apresentavam forma disseminada da moléstia. Podemos verificar que não há diferenças acentuadas entre as porcentagens de positividade nas reações de precipitação e de fixação do complemento, nos pacientes com duração da moléstia de menos de 1 ano e 1 ano ou mais. O mesmo acontece no que diz respeito ao título médio geral obtido nestes dois grupos. Chama a atenção nestes quadros a alta positividade da reação de fixação do complemento (acima de 95%).

## QUADRO XVIII

## FORMAS DISSEMINADAS

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 mês .....	3	3	3	16	115	63
2 meses .....	7	6	7	2,1	145	67
3 meses .....	6	3	5	—	128	51
4 meses .....	1	1	1	116	116	116
5 meses .....	4	3	3	—	80	28
6 meses .....	17	11	16	—	92	25
7 meses .....	7	6	7	9	186	55
8 meses .....	9	8	9	2	109	48
10 meses .....	4	4	4	9,5	63	27
11 meses .....	1	1	1	47	47	47
Total .....	59	46 (78%)	56 (95%)			Título médio geral 44,2

**QUADRO XIX**  
**FORMAS DISSEMINADAS**

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 ano .....	31	19	28	—	335	36
2 anos .....	19	15	18	—	190	44
3 anos .....	14	12	14	2	211	51
4 anos .....	6	4	6	2,9	37	20
5 anos .....	11	10	11	4,7	320	63
6 anos .....	4	3	4	10	130	44
7 anos .....	6	4	6	3,5	44	24
8 anos .....	6	6	6	11	177	60
9 anos .....	1	—	1	13	13	13
> 10 anos .....	9	7	9	5	129	31
Total .....	107	80 (74,8%)	103 (96,3%)			Título médio geral 41,1

O Quadro XX refere os resultados obtidos em pacientes considerados clinicamente curados, no momento do exame.

Devemos assinalar que muitos dos pacientes incluídos em qualquer um dos quadros apresentados estavam em tratamento, mas só foram incluídos nos 2 primeiros grupos aquêles pacientes considerados não curados, enquanto que, no último grupo, só foram incluídos pacientes clinicamente curados.

Devemos assinalar ainda que, nos 220 casos por nós analisados, somente em 8 obtivemos resultados negativos pelas reações de fixação do complemento e de precipitação ao primeiro exame. A sensibilidade dada pela associação das duas reações seria de 96,37%.

**QUADRO XX**  
**CASOS CLINICAMENTE CURADOS**

Duração	N.º de casos	Reação de precipitação	Reação de fixação do complemento, pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner			
		Positividade	Positividade	Título mínimo	Título máximo	Título médio
1 ano .....	6	3	5	—	11	4,5
2 anos .....	3	—	3	4,5	8	6
3 anos .....	6	2	6	2,8	10	6
4 anos .....	1	1	1	3,5	3,5	3,5
5 anos .....	2	—	1	2,8	2,8	2,8
6 anos .....	5	2	3	—	4,2	3,4
7 anos .....	2	1	2	2,7	5	3,8
8 anos .....	3	—	2	5,5	6,5	6
11 anos .....	1	—	1	3,4	3,4	3,4
12 anos .....	2	1	1	2	2	2
13 anos .....	1	—	—	—	—	—
Total .....	32	10 (31,3%)	25 (78,1%)			Título médio geral 3,9

Acontece porém que êstes 8 casos negativos se encontravam assim distribuídos pelos grupos que estabelecemos: 1 entre as formas localizadas, 2 entre as formas disseminadas e 5 entre as formas clinicamente curadas. Analisando, então, a sensibilidade das provas, excluindo as formas clinicamente curadas (32 casos), teremos a incidência de 3 resultados negativos em 188 casos, o que dá uma sensibilidade de 98,4%.

Voltamos a recordar que esta sensibilidade, revelada pela associação das duas provas, refere-se ao primeiro exame efetuado no sôro de cada paciente. É fácil supor que se os exames se repetirem, a sensibilidade aumentará.

**QUADRO XXI**  
**ESTUDO EVOLUTIVO DAS FORMAS LOCALIZADAS**

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
A.A.	1 mês	9/ 5/56	26,0	468	++++	++++	++++	-	Quando visto pela primeira vez, apresentava somente lesão da gengiva. Não apresentava adenopatia nem lesão pulmonar ao exame radiológico. Em 30/7/56, a lesão mucosa já havia cicatrizado. Continuou sempre sob tratamento e sem apresentar recaídas clínicas da moléstia. Em 17/4/59, radiografia dos pulmões revela ter havido comprometimento dessa viscera.
		30/ 7/56	39,0	735	++++	++	+++	++	
		1/10/56	31,0	320	++	+	-	-	
		3/12/56	14,0	195	++++	++++	++	-	
		4/ 2/57	12,0	219	-	-	-	-	
		21/ 6/57	4,0	97	-	-	-	-	
		27/ 8/57	32,0	380	-	-	-	-	
		20/12/57	6,2	90	-	-	-	-	
		25/ 2/58	3,4	80	+	+	-	-	
		31/ 3/58	5,4	101	++	-	-	-	
		19/ 6/58	6,2	54	-	-	-	-	
		15/ 9/58	4,5	80	++++	++	+	-	
		16/12/58	23,0	640	++	-	-	-	
		16/ 4/59	2,4	-	+++	+	-	-	
		31/ 6/59	3,5	49	+	-	-	-	
21/ 7/59	3,6	40	++	++	+	-			
L.M.	4 meses	5/ 5/58	-	25	++++	+++	+	-	Apresentava somente lesões da mucosa oral.
P. N.	6 meses	6/ 4/56	-	-	++++	++	+	-	Verificadas somente lesões do lábio inferior.

(Continua)

QUADRO XXI (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.F.	8 meses	30/ 8/58 27/10/58	3,6 27,0	66 320	+ ++	- -	- -	- -	Lesão mucosa do palato. Em 27/10/58, apesar do tratamento, havia piorado da lesão.
J.M.	9 meses	15/ 3/56 18/ 8/56 11/ 3/57 11/ 5/59	9,0 13,0 3,5 -	493 139 47 -	++ ++ - -	+ ++ - -	- + - -	- + - -	Lesão mucosa da gengiva e assoalho da boca. Em 11/5/59, há 2 anos sem tratamento e clinicamente curado.
C.C.	10 meses	26/11/56 28/ 2/57 18/ 9/57 20/12/57	- 2,0 2,7 2,3	- 160 85 -	++++ +++ +++ ++++	++++ + ++ +	++++ - - -	+++ - - -	Verificadas lesões mucosas da boca. Não apresentava adenoptia. Queixava-se de tosse e escarro. Em tratamento.
A.C.V.	1 ano	26/ 6/56 23/ 8/56 25/10/56 11/ 1/57 22/ 8/57	9,5 7,0 2,0 - -	349 95 - - -	+++ ++ - - ++	+++ + - - +	++ + - - -	- + - - -	Lesão do palato mole. Não havia adenopatia. Queixava-se de tosse e escarro. Em 23/8/56, a lesão mucosa já havia cicatrizado. Continuava em tratamento, quando visto pela última vez.

(Continua)

QUADRO XXI (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
A.B.F.	1 ano	22/ 7/57	13,0	61	+	+	-	-	Lesões da língua estendendo-se para epiglote e laringe. Não apresentou lesão pulmonar. Em 17/9/57, estava clinicamente curado. Continuou em tratamento até 21/11/58.
		17/ 9/57	29,0	91	-	-	-	-	
		25/11/57	6,8	160	-	-	-	-	
		23/ 1/58	6,5	160	++	+	+	-	
		17/ 3/58	11,0	117	-	-	-	-	
		20/ 5/58	4,2	113	-	-	-	-	
		23/ 7/58	2,8	50	-	-	-	-	
		18/ 9/58	2,0	48	-	-	-	-	
		21/11/58	3,0	20	-	-	-	-	
		25/ 2/59	3,1	-	-	-	-	-	
		23/ 5/59	4,0	-	-	-	-	-	
19/ 8/59	-	-	-	-	-	-	-		

(Continua)

QUADRO XXI (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
F.S.	2 ½ anos	7/11/55	7,0	195	—	—	—	—	Quando visto pela primeira vez, apresentava granuloma hipertrófico difuso do lábio. Era recaída de blastomicose mucosa, após haver abandonado o tratamento por 1 ano. Em 23/1/56, estava clinicamente curado. Em 19/7/58, há 23 meses sem tratamento, e clinicamente curado.
		23/ 1/56	4,5	127	+	—	—	—	
		3/ 4/56	7,0	260	—	—	—	—	
		6/ 6/56	6,0	48	+	—	—	—	
		17/ 8/56	7,5	109	—	—	—	—	
		15/10/56	3,0	62	—	—	—	—	
		14/12/56	3,0	112	—	—	—	—	
		19/ 3/57	2,5	—	++	+	—	—	
		18/10/57	—	—	—	—	—	—	
19/ 7/58	—	—	—	—	—	—			
V.T.	6 anos	18/12/56	6,0	100	++++	++++	+	—	Diagnóstico por biopsia da faringe. Não apresentava adenopatia nem lesão pulmonar.

## QUADRO XXII

### ESTUDO EVOLUTIVO DAS FORMAS DISSEMINADAS

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.Z.	1 ½ mês	13/ 4/57	69	2.228	++	+	-	-	Lesão mucosa na epiglote. Extensas lesões pulmonares. Em 13/8/57, lesões mucosas cicatrizadas. Continuou sempre em tratamento até 14/7/59. Clinicamente curado e passando bem.
		13/ 8/57	29	320	+	-	-	-	
		14/10/57	31	320	-	-	-	-	
		21/11/57	21	640	++	+	-	-	
		13/ 1/58	18	698	++	-	-	-	
		17/ 3/58	17	823	-	-	-	-	
		12/ 5/58	24	475	++++	+++	++	+	
		14/ 7/58	15	468	+++	++	+	-	
		15/ 9/58	24	830	+	-	-	-	
		4/11/58	26	640	++	-	-	-	
		12/ 1/59	19	1.470	-	-	-	-	
		12/ 3/59	15	435	-	-	-	-	
		11/ 5/59	10	160	++	+	-	-	
14/ 7/59	15	508	-	-	-	-			

(Continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
C.R.	2 meses	5/11/56	132	5.120	+++	++	-	-	Adenopatia cervical. Lesões granulomatosas não ulceradas no rosto. Em 5/1/57, já havia cicatrização completa das fistulas dos gânglios cervicais com diminuição acentuada do tamanho dos mesmos. Continuava em tratamento em 7/8/59. Clinicamente curada.
		10/ 1/57	116	3.507					
		25/ 2/57	11	1.413	-	-	-	-	
		8/ 7/57	7,5	63	-	-	-	-	
		27/ 8/57	3,0	20	-	-	-	-	
		28/ 8/58	4,0	160	+	-	-	-	
		29/ 4/59	-	139	++++	++++	+++	+	
		7/ 8/59	2,2	-	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
B.B.P.	3 meses	17/ 8/56	92	735	++	+	-	-	Lesão da faringe, do palato e pulmonar. Em 30/3/57, as lesões mucosas estavam completamente cicatrizadas. Em 10/8/59 mantinha-se clinicamente curado mas em tratamento, sendo que o mesmo foi interrompido várias vezes durante o período de observação.
		23/10/56	11	640	++	+	-	-	
		18/12/56	16	320	++++	+	-	-	
		28/ 2/57	9,5	254	-	-	-	-	
		30/ 3/57	2	160	-	-	-	-	
		16/ 8/57	11	97	-	-	-	-	
		23/11/57	6,7	92	-	-	-	-	
		5/ 5/58	6	88	-	-	-	-	
		11/ 7/58	2,9	-	-	-	-	-	
		15/12/58	4,5	101	-	-	-	-	
		23/ 3/59	-	28	++	-	-	-	
		17/ 4/59	-	-	-	-	-	-	
		11/ 8/59	2,3	40	+	-	-	-	
G.P.V.	6 meses	17/ 1/57	30	507	++++	++++	++	-	Blastomicose pulmonar grave mais caquexia. Até 13/3/58 tratamento irregular. Radiografia revela lesões pulmonares em atividade.
		22/ 2/57	12	1.613	++++	+++	++	-	
		13/ 3/58	7	698	++++	++++	++++	++	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.T.L.	8 meses	25/10/55	35	1.809	++++	++++	+++	+	Forma ganglionar, quando visto pela primeira vez. Em 20/9/56, forma cutânea e ganglionar generalizada. Resistência à sulfa. Melhora pela associação com Vitamina D <sub>2</sub> , até 12/4/58  Em seguida, quadro de septicemia blastomicótica. Tratamento com Anfotericina B e cura clínica.  Em 1959, novo tratamento com Anfotericina B baseado na evolução sorológica.
		20/ 9/56	258	6.450	++++	++++	+++	+	
		5/ 7/57	609	25.063	++++	++++	++++	++	
		19/ 8/57	865	20.480	++++	++++	+++	++	
		4/ 2/58	185	6.450	++++	++++	++++	++++	
		31/ 3/58	138	1.722	+++	++	+	-	
		12/ 4/58	96	3.978	+++	++	+	-	
		4/ 6/58	203	14.479	++++	++++	+++	++	
		24/ 6/58	62	1.896	++++	++	++	-	
		24/ 7/58	14	422	+++	+	-	-	
		4/ 9/58	17	254	+	+	-	-	
		1/10/58	14	1.050	-	-	-	-	
		22/12/58	8	368	++	-	-	-	
		21/ 5/59	19	640	+	-	-	-	
2/ 7/59	3	341	-	-	-	-			

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
H.V.	1 ano	8/ 3/57	31	538	++++	++++	++	+	Lesões laringeanas e pulmonares. Em 1/4/59, clinicamente curado em tratamento.
		2/ 5/57	18	184	++++	++++	++	+	
		4/ 7/57	6,5		++++	++++	+++	++	
		6/ 9/57	8	144	-	++	+	-	
		27/ 2/58	3,1	181	++	++	-	-	
		1/ 4/59	2,9	40	++	+	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
D.F.V.	1 ½ ano	20/11/55	21	1.114	++++	++++	++++	+++	Lesões da boca, laringe e pulmões. Em 19/4/56, melhora do quadro pulmonar, lesão mucosa ainda com sinais de inflamação.  Em 14/9/56, recaída das lesões mucosas apesar do tratamento.  Em 1958, foi internado para observação e sua evolução foi considerada boa. Sempre em tratamento durante o período de observação.
		6/12/55	29	870	++++	++++	++	+	
		4/ 2/56	9	1.050	+++	++	+	-	
		19/ 4/56	20	517	+++	+	-	-	
		14/ 9/56	31	438	+	-	-	-	
		3/11/56	10	320	-	-	-	-	
		17/ 1/57	13	480	-	-	-	-	
		6/ 2/57	15	845	-	-	-	-	
		30/ 3/57	5,5	190	++++	+++	++	+	
		8/ 6/57	16	452	-	-	-	-	
		18/ 7/57	7	254	-	-	-	-	
		25/11/58	6,5	106	-	-	-	-	
		17/ 2/59	5	63	-	-	-	-	
		13/ 5/59	5,5	80	+	-	-	-	
		26/ 5/59	7,4	180	-	-	-	-	
		14/ 7/59	7	121	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.R.S.	2 anos e 3 meses	18/ 4/58	39	805	++++	++	+	-	Lesões da gengiva e ganglionares generalizadas. Recaída quando visto pela primeira vez, com resistência à sulfa. Tratado com Anfotericina B, teve recaída e foi novamente tratado.
		29/ 4/58	14	422	++	+	+	-	
		31/ 5/58	14	160					
		5/ 9/58	22	640	-	-	-	-	
		21/10/58	18	215	-	-	-	-	
		9/ 1/59	5,7	160	-	-	-	-	
		6/ 3/59	7,6	160	-	-	-	-	
		7/ 7/59	4,4	160	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.C.	3 ½ anos	23/11/56	40	1.049	++++	+++	++	+	Lesões mucosas, ganglionares e pulmonares. Em 23/11/56 havia abandonado o tratamento há 1 ano, após cura clínica. Referia anorexia e dores abdominais indefinidas.  Reiniciou o tratamento e passou relativamente bem durante todo o período de observação.  Não abandonou o tratamento.
		26/ 1/57	46	772	++	—	—	—	
		16/ 3/57	17	320	++	++	+	—	
		21/ 5/57	14	177	++	+	—	—	
		2/ 7/57	137	24.350	+++	++	+	—	
		10/ 9/57	230	7.240	++++	++	+	—	
		20/11/57	35	570	++++	+++	++	—	
		14/ 1/58	21	490	++	—	—	—	
		8/ 4/58	27	592	++++	++++	+++	++	
		12/ 8/58	21	422	—	—	—	—	
		16/ 9/58	21	190	++	+	—	—	
		14/10/58	10	490	++	—	—	—	
		9/12/58	39	2.560	—	—	—	—	
		31/ 1/59	8,7	127	—	—	—	—	
		23/ 3/59	6,5	173	++	+	—	—	
6/ 6/59	27	254	+	+	+	—			

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.C.	4 anos	20/ 1/56	56	8.120	++++	+++	++	+	Lesões mucosas, cutâneas e ganglionares. Não se curou completamente. Fases de melhora e de recaída com tratamento sulfamidico. No 2.º semestre de 1958, tratamento com Anfotericina B, cura clínica. Em 26/6/59, voltou apresentando recaída ganglionar. Tratamento com sulfa de eliminação prolongada.
		17/ 9/56	215	5.120	++++	+	-	-	
		26/11/56	39	1.522	++++	++++	+++	+	
		13/ 4/57	100	2.560	++++	++++	+	-	
		18/ 6/57	31	2.560	++++	+++	++	++	
		18/10/57	36	3.620	++++	+++	++	+	
		8/ 8/58	46	1.280	++++	++++	++++	++	
		5/11/58	13	557	++++	+++	+	-	
		21/11/58	14	320	++++	++++	+++	+	
		22/12/58	13	845	++++	++	+	-	
		26/ 6/59	85	2.257	++++	++++	++++	++	
		24/ 9/59	15	1.522	++++	++++	++++	++++	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
T.R.	4 anos	28/11/55	22	780	++++	++	++	+	Lesões pulmonares e mucosas. Cura clínica por tratamento sulfamídico. As lesões pulmonares continuaram em atividade, sendo que, em 1/7/57, foi verificada escavação. Em 21/10/58, após passar 2 meses sem tratamento, houve recaída de lesão mucosa. Em 19/8/59, clinicamente curado. Exame radiológico apresentando quadro de fibrose pulmonar estacionária.
		7/ 2/56	9	254	++	-	-	-	
		3/ 5/56	22	148	-	-	-	-	
		17/ 7/56	15	188	-	-	-	-	
		20/ 8/56	42	139	+++	++	++	++	
		18/10/56	5,3	160	++	+	-	-	
		10/ 1/57	6	80	-	-	-	-	
		8/ 3/57	3,5	40	-	-	-	-	
		1/ 7/57	3,5	50	-	-	-	-	
		23/ 9/57	5,8	-	-	-	-	-	
		25/ 2/58	2,1	61	-	-	-	-	
		12/ 5/58	2,6	-	-	-	-	-	
		22/ 7/58	2,8	24	-	-	-	-	
		21/10/58	2,9	57	-	-	-	-	
		27/ 2/59	3,1	40	-	-	-	-	
		20/ 8/59	2,2	-	-	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
Z.J.D.	5 anos	7/11/55	6,5	422	++++	++++	++	+	Lesões tegumentares, linfáticas e pulmonares. Sempre em tratamento irregular com recaídas. Em fins de 1958, foi tratado com Anfotericina B.
		13/ 1/56	10	720	++++	+++	+++	+	
		31/10/56	14	411	+++	+++	++	+	
		4/ 1/57	68	1.522	++	+	-	-	
		22/ 2/57	58	806	+++	++	-	-	
		21/11/58	38	320	++++	+++	++	+	
		23/ 3/59	2	40	++	++	+	+	
S.S.	8 anos	31/10/58	177	6.758	++++	++++	+++	+	Forma generalizada. Caquexia. Tratamento com Anfotericina B. Cura clínica. Terminou o tratamento em 24/12/58. Continuou clinicamente curado, sem tratamento.
		2/12/58	24	905	++++	++++	++	+	
		22/12/58	16	452	+	-	+	-	
		16/ 1/59	11	415	++	+	+	-	
		6/ 3/59	12	640	++++	++++	++++	++++	
		3/ 4/59	3,2	403	+	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações	
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:					
					5	15	45	135		
R.R.N.	9 anos	2/ 4/58	7,8	211	++++	+++	++++	+	Lesões tegumentares, ganglionares e pulmonares. Tratado com Anfotericina B. Recaida mucosa. Novo tratamento. Cura clínica mantida até 16/1/59.	
		12/ 4/58	9,9	190	+	+	+	-		
		29/ 4/58	14	211	++	-	-	-		
		6/ 5/58	6,2	80	++++	++++	++	+		
		31/ 5/58	11	320	-	++++	++++	+++		
		2/ 7/58	2,3	89	++	+++	++	+		
		23/ 7/58	2,6	80	+	+++	++	++		
		11/ 8/58	2,1	-	-	-	-	-		-
		13/ 9/58	-	-	++++	++++	+++	+		
		16/10/58	-	-	+++	++++	++	-		
16/ 1/59	-	-	-	++	++	++	+			

(continua)

QUADRO XXII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
J.R.	15 anos	4/11/55	9,5	380	++++	++++	++	+	Forma generalizada. Numerosas recaídas. Tratado com Anfotericina B, a partir de 2/4/58. Alta, clinicamente curado, em 20/8/58. Em 2/10/58, recaída com lesão cutânea na orelha E. Novo tratamento com Anfotericina B. Alta clinicamente curado.
		8/ 7/57	9	293	+	+	-	-	
		2/ 4/58	12	254	+++	-	-	-	
		12/ 4/58	9	211	+	+	-	-	
		29/ 4/58	9	184	+++	++	+	-	
		31/ 5/58	11	170	++	++	++	-	
		27/ 6/58	6,5	97	-	-	-	-	
		20/ 8/58	9,5	101	-	-	-	-	
		2/10/58	8	452	++	++	+	-	
		5/12/58	5	80	++	-	-	-	
		9/ 1/59	3,7	180	++	+	+	-	
		30/ 1/59	7,5	160	+	+	-	-	
		16/ 2/59	5,4	160	+	+	-	-	
		19/ 6/59	8	160	+++	++	+	-	

## QUADRO XXIII

### ESTUDO EVOLUTIVO DAS FORMAS CLÍNICAMENTE CURADAS

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
S.C.	3 anos	6/12/55	3,6	80	++	+	-	-	Lesões mucosas e pulmonares. Cura clínica das lesões mucosas após 20 dias de tratamento. Lesões pulmonares — ótima evolução. Durante o período de observação, manteve-se clinicamente curado e em tratamento, sendo que fazia pequenas interrupções. Em 17/2/59, há 5 meses sem tratamento e clinicamente curado.
		11/ 2/56	2	43	-	-	-	-	
		12/ 4/56	3	80	+	-	-	-	
		16/ 6/56	2,7	47	++++	++	+	-	
		2/10/56	2	25	+	+	-	-	
		19/11/56	2,2	40	-	-	-	-	
		12/ 1/57	2,4	47	-	-	-	-	
		15/ 3/57	-	20	-	-	-	-	
		11/ 7/57	-	-	+	-	-	-	
		25/ 9/57	2	-	+	+	-	-	
		12/12/57	-	-	+	-	-	-	
		7/ 3/58	-	-	-	-	-	-	
		1/ 8/58	3,2	20	-	-	-	-	
		17/ 2/59	2,3	-	-	-	-	-	
A.C.	3 anos	6/ 9/56	6,5	27	+++	++	++	+	Blastomicose da mucosa bucal e pulmonar. Quando visto pela 1. <sup>a</sup> vez, há 2 anos, sem tratamento e clinicamente curado.
		10/ 5/57	5	50	+	-	-	-	

(continua)

QUADRO XXIII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R. F. C.		Reação de precipitação				Observações
			W. M. M.	S. V. N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
A.A.L.	4 anos	20/ 9/56	3,5	35	++	+	-	-	Forma ganglionar. Fêz tratamento durante 4 meses. Há 4 anos sem tratamento, mantendo-se clinicamente curado.
F.G.	7 anos	15/ 1/57 8/ 3/58	- -	- -	- -	- -	- -	- -	Lesões mucosas, ganglionares e pulmonares. Em 14/1/57, há 26 meses sem sulfa e clinicamente curado.
J.P.N.	7 anos	9/11/55 13/ 9/56 3/12/56 22/ 3/57 24/ 6/57 26/ 9/57 18/ 8/58 8/ 1/59	2,7 2,5 2,1 - - - 3 2,2	160 32 46 20 - 538 40 160	++++ - +++ ++ + ++ - -	++++ - +++ + - ++ - -	+++ - + - - + - -	++ - - - - - - -	Lesões pulmonares, mucosas e ganglionares. Durante o período de observação, manteve-se clinicamente curado. Aspecto radiológico de fibrose pulmonar e tumoração mediastínica. Em tratamento.

(continua)

QUADRO XXIII (continuação)

Nome	Duração da moléstia	Data	R.F.C.		Reação de precipitação				Observações
			W.M.M.	S.V.N.	Antígeno 1:				
					5	15	45	135	
P.B.	8 anos	2/ 6/56	6,5	171	—	—	—	—	Lesões mucosas e pulmonares. Quando visto pela primeira vez, estava clinicamente curado e assim se manteve durante o período de observação. Quadro radiológico pulmonar revelando lesões fibrosas. Em tratamento até março de 1957.
		2/ 9/56	13	160	—	—	—	—	
		20/10/56	4,2	243	+	++	—	—	
		30/10/56	7,5	145	—	—	—	—	
		14/12/56	5	104	—	—	—	—	
		8/ 3/57	3,5	97	—	—	—	—	
		24/ 7/57	—	—	—	—	—	—	
		8/ 1/58	2,9	40	—	—	—	—	
		24/10/58	3,2	80	—	—	—	—	
		M.P.	13 anos	29/ 9/56	—	—	—	—	

Passemos agora a referir os resultados obtidos no estudo evolutivo dos pacientes pertencentes aos vários grupos.

O Quadro XXI registra os resultados verificados numa série de casos classificados inicialmente como formas localizadas da moléstia. Neste quadro, constam na primeira coluna, as iniciais do paciente; na segunda, a duração da moléstia antes da primeira amostra de sôro, em seguida, as datas de colheita dos soros; o resultado das reações de fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER; o resultado da reação de fixação do complemento pela técnica de STEIN & VAN NGU; o resultado da reação de precipitação com as quatro diluições de antígeno e, finalmente, as observações mais importantes sôbre o caso.

Procuramos incluir, neste quadro, casos com vários períodos de evolução da moléstia antes do início de nossa observação. Verificamos a inclusão, neste grupo, de caso classificado inicialmente como forma localizada da moléstia (paciente A.A.) que, contudo, era de forma disseminada, como poderíamos verificar de início, se contássemos com todos os dados de ordem clínica. Submetido a exame radiológico, após conhecimento do comportamento sorológico, revelou lesões pulmonares residuais, indicando comprometimento também dessa víscera, ao lado das lesões mucosas, que o paciente apresentava.

O Quadro XXII, organizado do mesmo modo que o quadro anterior, apresenta os resultados obtidos nas formas disseminadas da moléstia. São apresentados 15 casos, onde podemos verificar os vários tipos de evolução da forma disseminada da blastomicose sul-americana. Neste grupo de pacientes verificamos, como regra geral, a presença de altos níveis de anticorpos fixadores do complemento e a positividade da reação de precipitação, quando a moléstia se encontra em atividade. Verifica-se ainda que, nesta forma de blastomicose, não há influência da duração da moléstia sôbre a positividade da reação de precipitação, sendo que as precipitinas se encontravam presentes em paciente cuja moléstia existia há 15 anos.

Finalmente, no Quadro XXIII, também com a mesma organização, expomos os resultados obtidos em 7 casos clinicamente curados. Verificamos, neste quadro, casos clínica e sorologicamente curados (F.G. e M.P.). Nos outros, baixo teor em anticorpos fixadores do complemento, com a reação de precipitação ainda positiva em alguns soros.

Passemos aos resultados obtidos em 11 casos de blastomicose sul-americana, que apresentaram aspectos especiais. O caso F. E., 13 anos, masculino, côr preta, era portador de blastomicose sul-americana e lepra tuberculóide. Os soros obtidos neste caso revelaram sempre alto nível de anticorpos fixadores do complemento. Foram examinadas quatro amostras de sôro durante os meses de outubro e novembro de 1954, com os seguintes resultados respectivamente pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e de STEIN & VAN NGU — títulos de 78, 59, 63, 45 e 2.318, 2.560, 2.118 e 2.348.

Dois casos apresentavam associação com tuberculose pulmonar. Um dêles — A. P., 45 anos, masculino, branco, com lesões ulcerosas da gengiva e extensas lesões pulmonares aos Rx. Exame direto positivo para *Paracoccidioides brasiliensis*, em material de lesão da gengiva e no escarro. Exame bacterioscópico e cultura do escarro positivos para B. K. Examinamos dois soros dêsse paciente; 1, em 26/12/56, revelou títulos em fixação do complemento de 2 e 100, respectivamente pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e STEIN & VAN NGU e reação de precipitação fortemente positiva; outro sôro, em 22/2/57, em que tanto as reações de fixação do complemento como de precipitação foram negativas.

Outro caso — J. M., 51 anos, masculino, branco, com lesão de laringe (biopsia e exame de escarro positivos para *Paracoccidioides brasiliensis*). Tratado com Sulfas e Iodeto de potássio, piorou bastante, sendo que, após 9 dias, o exame de escarro foi positivo para bacilos álcool-ácido-resistentes e a radiografia dos pulmões revelava lesão de ápice. Um exame sorológico para blastomicose demonstrou título de 2,2 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER (na fixação do complemento), reação negativa pela técnica de STEIN & VAN NGU e precipitinas negativas.

Um caso internado no Hospital das Clínicas, com diagnóstico de mal de Addison — F. P., 33 anos, masculino, branco, há 5 anos apresentava lesões nasais e da bôca com enfartamento ganglionar satélite, sendo que tôdas as manifestações regrediram rapidamente pelo tratamento sulfamídico. Apresentou, depois, várias recaídas. Quando se iniciou nossa observação, apresentava somente sinais de insuficiência supra-renal. Examinamos, dêsse paciente, 7 amostras de soros, com os seguintes resultados:

## QUADRO XXIV

RESULTADOS OBTIDOS NO CASO F. P. REFERIDO NO TEXTO

Data	Título pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Título pela técnica de Stein & Van Ngu	Reação de precipitação			
			Antígeno			
			1/5	1/15	1/45	1/135
14/ 6/56	6,5	184	++	+	+	-
27/ 7/56	5,5	197	+++	+++	++	++
28/10/58	4,6	63	-	-	-	-
12/12/58	2,7	28	-	-	-	-
29/12/58	-	-	-	-	-	-
8/ 1/59	2,4	40	-	-	-	-
7/ 4/59	-	-	-	-	-	-

Registramos, também, 5 casos de blastomicose sul-americana que apresentaram sintomatologia nervosa. Um dos pacientes — B. R., 47 anos, masculino, branco, era portador de paraplegia flácida, com lesões cicatrizadas na língua e no ânus. Não teve confirmação laboratorial de blastomicose, no Hospital das Clínicas. Examinamos 3 amostras de soros, com resultados negativos pelas reações da fixação do complemento.

Outro paciente, E. B., era portador de forma localizada na epiglote, em 1956. Em dezembro de 1957, foi operado de tumor cerebral, que se verificou ser blastomicótico, sendo que o paciente faleceu no pós-operatório. Examinamos duas amostras de sôro, uma em julho de 1956, com título 4,5 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e 103 pela técnica de STEIN & VAN NGU e outra em outubro de 1956, com título 2,5 e 22 respectivamente pelas técnicas referidas. Em ambos os soros verificamos auto-precipitação nas provas para pesquisa de precipitinas.

O paciente E. A. S. de 46 anos, masculino, pardo, apresentava blastomicose ganglionar e quadro de paralisia progressiva no lado esquerdo, em 1953. Examinamos 7 amostras de soros em 1954, de

junho a outubro, com título máximo de 2,8 pela prova de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e provas sempre negativas pela técnica de STEIN & VAN NGU. Outra amostra de sôro, examinada em 23/5/58, foi negativa pelas provas de fixação do complemento e de precipitação. O paciente apresentava, então, seqüela de paralisia espástica do lado esquerdo.

O paciente J. P., 43 anos, masculino, branco, apresentava lesão da mucosa oral em 1954 e, em 1956, reação de fixação do complemento positiva no *liquor*. Título de anticorpos fixadores do complemento no sôro, em 28/6/54 — 28/7/55 e 10/2/56, de 10, 15 e 13 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e de 113, 373 e 557 pela técnica de STEIN & VAN NGU.

Finalmente, o caso F. V., 38 anos, branco, masculino, diagnosticado por biopsia de gânglio cervical, estava em tratamento desde dezembro de 1953, quando, em agosto de 1955, passou a apresentar parestesias dos membros inferiores. Internado, em 1/9/55, com diagnóstico de blastomicose pulmonar mais paraplegia flácida por mielite transversa em D<sub>11</sub>. Este paciente, melhorado, apresenta ainda em 23/6/59, seqüelas da lesão neurológica, reveladas pela marcha. A evolução sorológica dêste paciente foi a seguinte:

### QUADRO XXV

RESULTADOS OBTIDOS NO SÔRO DO CASO F.V. REFERIDO NO TEXTO

Data	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
	Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
			1/5	1/15	1/45	1/135
17/ 5/55	17	172				
17/ 9/55	31	1.114				
19/10/55	26	640				
27/ 3/56	11	220	—	—	—	—
15/10/56	12	373	++	—	—	—
10/ 5/57	27	290	++	+	—	—
20/ 8/57	30	845	—	—	—	—
15/ 1/58	16	193	—	—	—	—
11/ 6/58	6	101	—	—	—	—
25/11/58	14	238	—	—	—	—
23/ 6/59	8	149	—	—	—	—

Os exames realizados no *liquor*, dêste caso revelaram os seguintes resultados:

## QUADRO XXVI

RESULTADOS OBTIDOS NO LIQUOR DO CASO F. V. REFERIDO NO TEXTO

Data	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
	Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
			1/5	1/15	1/45	1/135
14/ 9/55	6,2					
29/ 9/55	2,8	--				
18/10/55	2,8	--				
2/12/55	--	--	--	--	--	--
4/ 1/56	--	--				
20/ 1/58	--	--	+	--	--	--

As outras quatro observações de nossa casuística consistem de casos particulares que servem para demonstrar o valor diagnóstico das provas imunológicas.

O paciente, A. A., 32 anos, masculino, branco, foi observado a partir de um inquérito epidemiológico, realizado em candidatos a carteira de saúde, no "Instituto Clemente Ferreira", pela reação intradérmica à paracoccidioidina. Realizamos as reações sorológicas em duas amostras de soro com os seguintes resultados: em 16/9/58, reações de fixação do complemento positivas com os títulos de 20 e 353, respectivamente, pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e de STEIN & VAN NGU e reação de precipitação positiva (++) com as diluições 1/5 e 1/15 do antígeno e positiva (+) com a diluição 1/45; em 11/10/58, reações de fixação do complemento positivas, apresentando títulos de 18 e 905, respectivamente, pelas técnicas de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e STEIN & VAN NGU e reação de precipitação positiva (++) com diluição a 1/5 do antígeno e positiva (+) na diluição a 1/15. Numerosos exames de escarro negativos para *Paracoccidioides brasiliensis* e para bacilos álcool-ácido-resistentes. Quadro radiológico compatível com o diagnóstico de blastomicose pulmonar.

Outro paciente foi submetido a exames sorológicos por ser filho de doente blastomicótico. Trata-se do paciente E. B., 23 anos,

masculino, branco. Há 10 anos apresenta tosse, escarro e períodos febrís acompanhados de indisposição geral. Por apresentar sorologia positiva, foi submetido a uma série de exames de escarro até resultado positivo para *Paracoccidioides brasiliensis*, o que ocorreu após 1 ano de observação. Fizeram-se então, vários tratamentos de 1 a 2 meses com Sulfa. Após o primeiro tratamento, a melhora foi muito evidente na tosse e na quantidade de escarro. A sorologia dêste paciente revelou os seguintes resultados:

### QUADRO XXVII

RESULTADOS OBTIDOS NO CASO E. B. REFERIDO NO TEXTO

Data	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
	Wadsworth, Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
			1/5	1/15	1/45	1/135
4/ 6/56	5,0	103	—	—	—	—
30/10/56	2,5	56	+	—	—	—
20/ 3/57	2,8	49	+	—	—	—
30/ 7/57	2,5	44	+	—	—	—
11/10/57	3,9	40	—	—	—	—
11/ 3/58	2,7	90	—	—	—	—
31/ 7/58	4,7		+	—	—	—
9/10/58	2,4	101	—	—	—	—
17/ 2/59	2,4	40	—	—	—	—
26/ 5/59	3,0	25	—	—	—	—

As duas últimas observações desta série referem casos em que o diagnóstico de blastomicose foi suspeitado ser incorreto através dos resultados obtidos pela sorologia.

O paciente O. A., 61 anos, masculino, branco, referia a seguinte história: há 2 anos, dor de garganta e lesão da mucosa bucal. A

biopsia revelou tratar-se de blastomicose. Tratamento com Sulfas até cicatrização da lesão mucosa. Continuou, no entanto, com adenopatia cervical e repetiu tratamentos com Sulfas, irregularmente. Atendemos ao paciente, pela primeira vez, em 22/10/58, sendo que a sorologia revelou, pela fixação do complemento, título 2 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e resultado negativo pela técnica de STEIN & VAN NGU e a reação de precipitação também negativa. Outro exame, feito em 27/11/58 revelou o mesmo resultado, após tratamento durante 1 mês, sendo que as condições do paciente continuavam inalteradas. Foi então feita biopsia de gânglio cervical, por nossa sugestão. O exame histopatológico demonstrou tratar-se de carcinoma.

No paciente A. T., 51 anos, masculino, branco, teve início a moléstia em 1951, com ulcerações na laringe, e rouquidão. Foi tratado com Sulfa. Em 1955, necessitou ser traqueostomizado. Em 1958, foi operado das amígdalas. Em outubro de 1958, apareceu gânglio no ângulo direito da mandíbula que aumentou continuamente de tamanho, transformando-se em massa tumoral dura, de limites mal definidos. Continuava traqueostomizado. Tratamento sulfamídico sem melhora da tumoração. Dois exames sorológicos para blastomicose em 19/2/59 e 11/3/59 negativos por fixação do complemento e por precipitação. Resultado de biopsia em 25/3/59 — carcinoma plano celular.

Outra pesquisa que julgamos de interêsse, no estudo da blastomicose sul-americana, foi a da verificação do possível contágio inter-humano. Não se conhecem casos de "blastomicose-doença", em que se possa responsabilizar o contágio inter-humano como origem da infecção. Devido a não dispormos, ainda, de antígeno padronizado para realização de reações intradérmicas na pesquisa de "blastomicose-infecção", procuramos realizar inquérito entre os familiares de pacientes de blastomicose, pela verificação de anticorpos circulantes. Realmente, às vêzes, a "micose-infecção" pode, por maior estímulo antigênico, ocasionar o aparecimento de anticorpos circulantes. Durante os anos de 1956 a 1959 examinamos soros de 47 familiares de doentes de blastomicose sul-americana.

No Quadro XXVIII, estão expostos os resultados encontrados. A primeira coluna refere o grau de parentesco com relação ao doente; a segunda coluna, o número de casos em cada grupo e as outras colunas, o número de resultados positivos da reação de fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER &

MALTANER; o número de resultados positivos da reação de fixação do complemento pela técnica de STEIN & VAN NGU e o número de resultados positivos das reações de precipitação.

### QUADRO XXVIII

RESULTADOS OBTIDOS EM FAMILIARES DE DOENTES DE BLASTOMICOSE

Parentesco	N.º de casos	Reação de fixação do complemento pelas técnicas de		Reação de precipitação			
		Wadsworth Maltaner & Maltaner	Stein & Van Ngu	Antígeno a			
				1/5	1/15	1/45	1/135
Cônjuges ....	20	1	0	4	2	0	0
Filhos .....	14	1	1	0	0	0	0
Pais .....	5	0	0	1	0	0	0
Outros parentes .....	8	0	0	1	0	0	0
Total .....	47	2	1	6	2	0	0

Devemos assinalar que o título da única reação positiva entre os cônjuges, na fixação do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER, foi de 2,2; que as 4 reações de precipitação positivas com antígeno a 1/5 e as duas com antígeno a 1/15, eram fracamente positivas e assinaladas com uma cruz (+) sòmente. A reação de fixação do complemento, positiva pelas duas técnicas utilizadas, no grupo dos filhos, foi obtida sòmente no caso E. B. referido anteriormente no Quadro XXVII. As outras duas reações de precipitação positivas, uma no grupo dos pais e outra no grupo de outros parentes, eram fracamente positivas (+). Finalmente, queremos ressaltar que só pesquisamos parentes que residiam junto com os doentes de blastomicose e que apresentavam possibilidades de contágio.

### COMENTÁRIOS

As provas imunológicas aplicadas no estudo de infecções têm sua eficiência estreitamente vinculada à obtenção de bons antígenos. Porque reconhecemos êste fato é que incluímos, neste trabalho, novas pesquisas sòbre o antígeno que utilizamos e que já teve seu

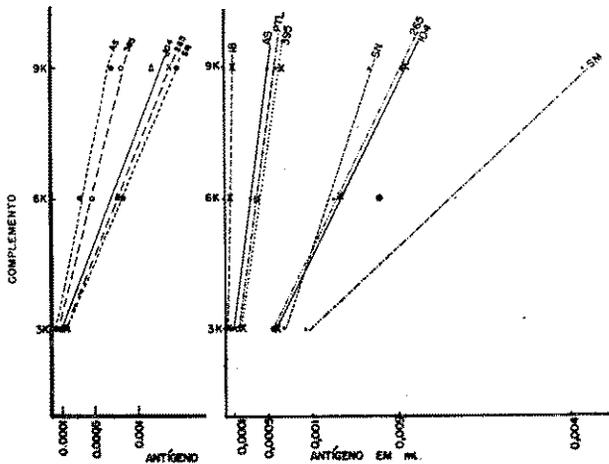
estudo realizado, parcialmente, em nossa tese de doutoramento. Como é referido no Quadro I, a reprodutibilidade do antígeno, que já foi preparado 22 vezes, é muito razoável, dado que a variação na capacidade fixadora é relativamente pequena, de uma partida para outra. Agora sabemos, também, que a conservação do antígeno se faz muito bem em geladeira, em condições estéreis, durante 3 anos, sem variação nas suas propriedades. A natureza polissacarídica do antígeno induziu-nos a realizar as experiências de imunização de coelhos referidas no Capítulo II. Queríamos demonstrar sua condição de antígeno hapteno em relação a este animal. Realmente não verificamos a produção de anticorpos pela injeção endovenosa em coelho. Também não conseguimos demonstrar produção de anticorpos por injeção intramuscular e endovenosa de vacina constituída por suspensão de células leveduriformes mortas pelo calor, do *Paracoccidioides brasiliensis*. A única conclusão possível dessa experimentação limitada seria a de que o *Paracoccidioides brasiliensis*, tal como foi empregado, tem baixo ou nulo poder imunogênico para o coelho.

Interessamo-nos, também, em verificar se tôdas as 8 amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*, que normalmente utilizamos no preparo do antígeno, seriam produtoras de "polissacarídeo-antígeno". Pesquisas semelhantes foram realizadas por SMITH & colab. (1950) e PAPPAGIANIS & KOBAYASHI (1958), no que diz respeito à obtenção de coccidioidina; por SCHUBERT & colab. (1953), no estudo do valor antigênico de vários lotes de histoplasmina e por SCHUBERT & AJELLO (1957), na verificação das diferenças entre várias amostras de *Histoplasma capsulatum* empregadas como antígeno, sob forma de células leveduriformes, em reações de fixação do complemento.

Numa experiência preliminar (Quadro II), verificamos que as amostras 18 e AS de *Paracoccidioides brasiliensis* liberavam maior quantidade de "polissacarídeo-antígeno", comparativamente às outras amostras, apresentando por isso, poder fixador ótimo para 3 e 6 unidades de complemento, em diluições maiores. Repetimos a experiência, anotando também, as percentagens das suspensões de que partimos para extração dos antígenos em relação ao peso das células (Quadro III). Realizamos para análise mais pormenorizada dessas preparações, curvas de isofixação para o sistema blastomicose (Quadros IV a VI e Gráfico 2), como aconselhado por ALMEIDA (1956), e cálculos feitos de acôrdo com RAPPORT & GRAFF (1957). As curvas de isofixação indicavam que, usando 0,02 ml do sôro (no caso mistura de soros de pacientes de blastomicose), estávamos

utilizando excesso de anticorpos e, portanto, maior fixação de complemento iria depender unicamente de maior quantidade de antígeno presente. Tínhamos, então, condições ideais para obtenção das linhas de regressão antígeno-complemento, como foram feitas (Quadros VII a XIV e Gráfico 3). Já na experiência anterior, empregando o mesmo método de trabalho, conseguimos linhas de regressão antígeno-complemento para 5 antígenos de amostras separadas (Gráfico 1). Podemos observar, pela comparação dos Gráficos 1 e 3, representados no Gráfico 4, que as diferenças entre os antígenos se verificaram de modo semelhante nas duas experiên-

GRÁFICO 4  
GRÁFICOS 1 E 3 FOTOGRAFADOS LADO A LADO PARA COMPARAÇÃO



cias. Este tipo de inscrição gráfica, igual ao utilizado por ALMEIDA (1958), indica, quando tôdas as linhas de regressão convergem para um mesmo ponto, que as diferenças entre as várias preparações são quantitativas.

Reconhecemos que o número de experiências realizadas nesta verificação foi insuficiente para conclusões definitivas, mas a coincidência dos resultados, obtido nas duas vêzes, parece indicar, com certa segurança, que existem amostras de *Paracoccidioides brasiliensis* que libertam maior quantidade de "polissacarídeo-antígeno", comparativamente a outras.

Iniciando os comentários referentes ao capítulo de resultados, devemos definir nosso ponto de vista no modo de encarar o estudo imunológico de uma infecção qualquer. Ele tem seus fundamentos no que acontece quando agente infeccioso penetra o organismo de hospedeiro suscetível. A penetração do agente infeccioso pode causar:

- a) Infecção (sem doença), na qual não existem manifestações clínicas e só podemos dela tomar conhecimento

quando dispomos de prova intradérmica fiel, que nos revelará a produção de anticorpos cuti-sensibilizadores por parte do organismo infetado;

- b) Infecção benigna, em que há sinais clínicos da moléstia, mas esta evolui espontaneamente para a cura. Nestes casos, além da positivação da prova intradérmica, verifica-se a produção de anticorpos circulantes que persistem durante tempo variável no sangue do hospedeiro, após a cura da infecção. Neste tipo de infecção, devido às manifestações clínicas presentes, podemos estabelecer com certa precisão o tempo necessário ao aparecimento de anticorpos cuti-sensibilizadores e dos vários tipos de anticorpos circulantes após o início da infecção. Sabemos que anticorpos cuti-sensibilizadores persistem no organismo infetado geralmente pelo resto da vida e quando desaparecem só o fazem muito tardiamente. Aqui temos, no entanto, um tipo de infecção que se presta muito bem para verificar quanto tempo demora para desaparecerem os anticorpos circulantes após a cura clínica;
- c) Infecção grave, sob forma crônica progressiva ou de infecção generalizada. Nestes casos pode-se verificar reação intradérmica negativa, correspondendo a mau prognóstico, pois indica fase de anergia do organismo infetado. Os anticorpos circulantes geralmente estão presentes em níveis variáveis, de acordo com a etiologia da infecção.

Já vimos, no Capítulo I, o que se conhece da imunologia da coccidioidomicose, histoplasmose, blastomicose norte-americana e blastomicose sul-americana. Poderemos salientar o trabalho de SMITH & colab. (1950) sobre a coccidioidomicose, cujos achados podem muito bem ser enquadrados no esquema que acabamos de traçar. Não vamos discutir o que se passa em outras micoses profundas, mas chamar a atenção para nossos achados no estudo imunológico da blastomicose sul-americana.

Durante a execução deste trabalho, não dispúnhamos de antígeno padronizado para a execução de reações intradérmicas. Colaboramos no entanto, em trabalho de LACAZ & colab. (1959), onde parece ser conclusão lógica que a blastomicose-infecção existe. Nada sabemos sobre a possível importância da reação intradérmica no prognóstico dos casos de blastomicose sul-americana. Conclusões

dêsse tipo, além de dependerem de reação intradérmica digna de confiança, necessitam seguimento prolongado dos pacientes para serem alcançadas.

Dos resultados do presente trabalho, conseguidos através da pesquisa de 2 tipos de anticorpos circulantes (precipitinas e fixadores do complemento), várias conclusões podem ser obtidas.

Inicialmente chama a atenção do exame dos Quadros XVI a XX o pequeno número de formas localizadas da blastomicose sul-americana existente em nossa casuística, já que 22 casos, num total de 220, constituem apenas 10%. Esta pequena incidência de formas localizadas parece depender da falha em se diagnosticarem formas benignas, iniciais e localizadas da moléstia. Queremos chamar a atenção do leitor para o fato de que o esquema a que submetemos o estudo imunológico da blastomicose sul-americana não corresponde exatamente ao agrupamento de nossos resultados, isto é, as formas benignas de infecção geralmente são localizadas, mas algumas podem apresentar certa disseminação, como em raros pacientes que observamos, de lesão pulmonar e mucosa. Nestes casos encontramos comportamento imunológico próprio da forma localizada da infecção e a evolução clínica após o tratamento demonstra que são formas benignas. No grupo de formas localizadas, pudemos verificar, como já assinalamos, a inclusão de alguns casos de formas disseminadas, como o reexame clínico demonstrou, depois que o comportamento imunológico levantou a suspeita. Pela análise dos Quadros XVI e XVII, verificamos que as precipitinas estavam presentes em 100% dos pacientes em que a evolução da moléstia era de menos de 1 ano, enquanto que os anticorpos fixadores do complemento estavam presentes em 66,6% dos casos. Isto indica que, destes anticorpos circulantes, as precipitinas aparecem mais precocemente e os anticorpos fixadores do complemento mais tardiamente. Nos pacientes em que a duração da moléstia era de mais de 1 ano, as precipitinas foram positivas somente em 40% dos casos, o que indica que estes anticorpos desaparecem mais rapidamente da circulação. Podemos verificar que o comportamento dos anticorpos fixadores do complemento foi diferente, pois a percentagem de positividade é maior naqueles casos em que a duração da moléstia era de mais de 1 ano. Outro fato importante, que se verifica pela análise dos Quadros XVI e XVII, é que o teor em anticorpos fixadores do complemento (título médio geral), nos soros dos pacientes com moléstia durando mais de 1 ano, é significativamente menor do que naqueles apresentando moléstia com duração de menos de 1

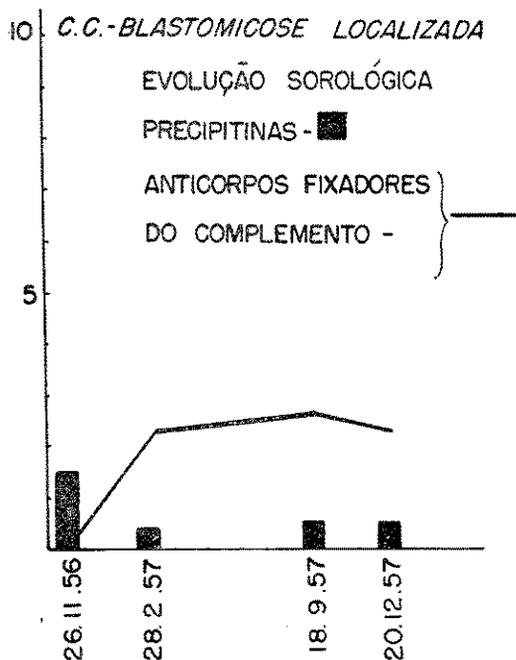
ano. Em nossa opinião isto indica circunscrição do foco infeccioso por parte do organismo que, então, fica sujeito a menor estímulo antigênico.

Os resultados encontrados, neste grupo de pacientes, foram os seguintes: precipitinas aparecendo precocemente e também desaparecendo rapidamente da circulação; anticorpos fixadores do complemento aparecendo mais tardiamente em teor sempre baixo, porém maior nas formas de curta duração e persistindo durante muito tempo. Estes achados são confirmados pelo estudo evolutivo dos pacientes (Quadro XXI). Em alguns pacientes dêste grupo, o tratamento proporciona cura clínica que não se acompanha de cura imunológica e isto é indicado pela persistência das precipitinas (caso C.C. do Quadro XXI, representado no Gráfico 5. Neste gráfico, bem como nos demais que representam o estudo evolutivo de pacientes, as ordenadas representam os títulos de anticorpos fixadores do complemento pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER. As colunas representam, em altura, a soma das cruzes conferidas às reações de precipitação com as 4 diluições do antígeno, sendo que 1 cruz foi representada por 1 mm de altura). A imunologia indica, então, que a moléstia não está curada e recaídas podem ocorrer pela interrupção do tratamento.

Pela análise dos Quadros XVIII e XIX, concluímos que as formas disseminadas da blastomicose sul-americana se caracterizam

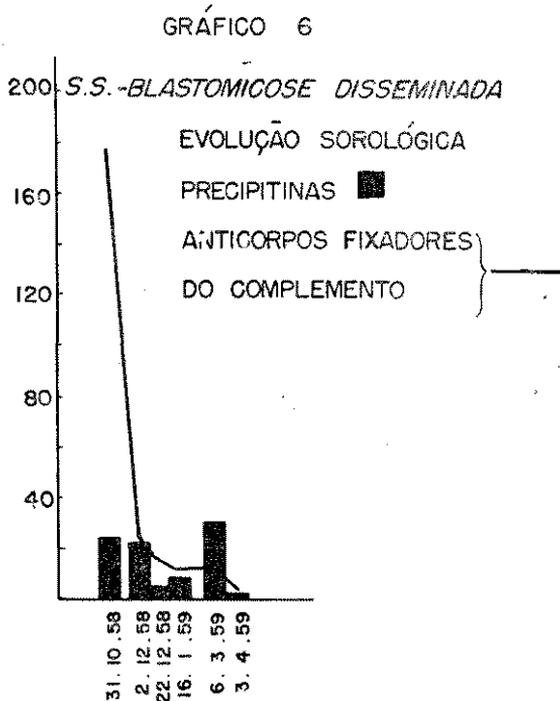
imunologicamente por apresentarem alto teor de anticorpos fixadores do complemento. Raramente encontramos ausência de anticorpos fixadores do complemento em pacientes dêste grupo, pois a reação nos dá sensibilidade de 95% e 96,3% respectivamente para

GRÁFICO 5



os que apresentam evolução de menos de 1 ano e de mais de 1 ano. Também as precipitinas estão presentes na maioria dos casos, com freqüência de 78% e 74,8%. Pensamos que a alta percentagem de reações de precipitação positivas em pacientes com moléstia de longa duração corresponde, em nossa casuística, principalmente a termos feito na organização dos Quadros XVIII e XIX a anotação do primeiro exame dos pacientes e em sua maioria eles compareciam ao exame por apresentarem recaída da moléstia. Realmente a observação do Quadro XXII, que contém o estudo evolutivo desses pacientes, nos ensina que as precipitinas desaparecem com certa rapidez quando o paciente é submetido a tratamento eficiente, para reaparecerem por ocasião das recaídas. A presença de precipitinas no sôro dos pacientes desse grupo indica, a nosso ver, atividade da moléstia. Já verificamos a correspondência de reações de precipitinas positivas com outras provas da chamada fase aguda do sôro (FAVA NETTO & colab., 1959). Frequentemente o reaparecimento das precipitinas se acompanha simultânea ou posteriormente da elevação do teor de anticorpos fixadores do complemento. Pelo exame do Quadro XXII, verificamos, ainda, que os anticorpos fixadores do complemento persistem durante muito tempo

após a cura clínica do paciente. A positividade da reação, com teor de anticorpos de título igual ou maior que 10 pela técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER indica, a nosso ver, que a terapêutica não pode ser interrompida. Em certos pacientes desse grupo a queda do teor de anticorpos fixadores do complemento é rápida e grande, indicando que eles se comportam imunologicamente como casos agudos. O Gráfico 6 (ca-



so S. S.) representa evolução desse tipo. Em outros casos o estudo evolutivo não indica melhora imunológica correspondendo à melhora clínica, que é muito rápida e evidente (caso J. R. — Quadro XXII). Seria exemplo de forma disseminada crônica. O Gráfico 7 representa a evolução sorológica em caso resistente ao tratamento sulfamídico. Verificamos, nesse caso (P. T. L. — publicado por CUNHA & colab., 1959), a

elevação progressiva do teor em anticorpos até 19/8/1957, quando, por influência de tratamento associado com Sulfa mais Vitamina D<sub>2</sub> (iniciada em dezembro), melhora clínica se acompanhou de queda do teor de anticorpos. Em junho de 1958, no entanto, o paciente apresentava recaída da moléstia sob a forma septicêmica, com elevação dos anticorpos fixadores do complemento. É exemplo, portanto, de recaída clínica e sorológica. O Gráfico 8 nos mostra recaída unicamente sorológica. Trata-se do paciente P. C. que, durante o período de observação, manteve-se clinicamente

curado, apresentando somente queixas mal definidas mas teve recaída da moléstia, revelada somente pela sorologia, durante o segundo semestre de 1957. Como regra, o comportamento imunológico dos pacientes desse grupo se caracteriza por alto teor em anticorpos fixadores do complemento, precipitinas presentes sempre que a moléstia se encontra em atividade, desaparecimento das precipitinas em numerosos casos por influência do tratamento e queda progressiva no teor dos anticorpos fixadores do complemento. Recaídas são frequentes com reaparecimento das precipitinas e aumento do teor de anticorpos fixadores do complemento. As recaídas podem ser clínicas e sorológicas ou somente sorológicas.

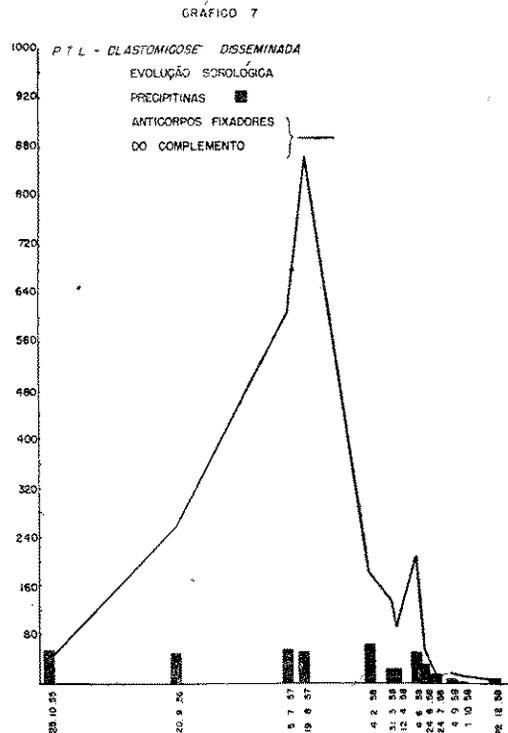
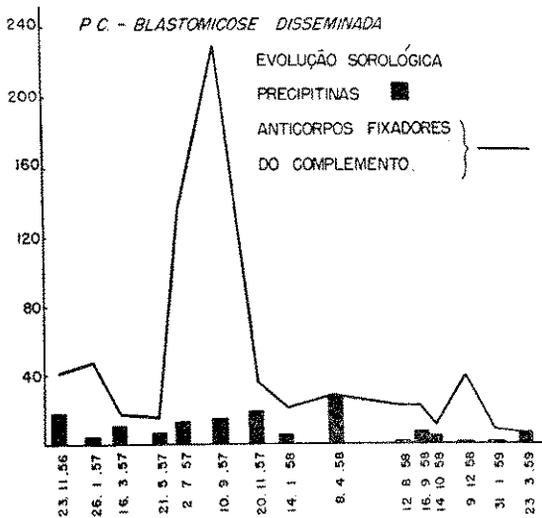


GRAFICO 8



O que caracteriza o grupo de formas clinicamente curadas (Quadro XX) é a percentagem baixa de reações de precipitação positivas, a frequência ainda relativamente elevada de reações de fixação do complemento positivas, e o baixo teor de anticorpos fixadores de complemento encontrado no sêro desses pacientes. Em muitos desses pacientes, acreditamos que esse baixo teor de anticorpos fixadores

do complemento, com reação de precipitação negativa, indique verdadeira cicatriz sorológica, sendo que devem ser considerados curados. O estudo evolutivo desses casos (Quadro XXIII) demonstrou-nos que a suspensão do tratamento pode ser feita após a estabilização por 6 meses ou mais do teor de anticorpos em título menor que 5. Neste quadro incluímos casos de cura clínica, com negatificação completa das reações sorológicas (casos F. G. e M. P.), indicando que, certamente, há casos de cura da blastomicose sul-americana, pois o caso M. P. está curado há 10 anos.

Em nossos resultados, mostramos ainda a possibilidade de associação da blastomicose com outras moléstias, como a lepra e a tuberculose. Chama a atenção, nos dois casos de associação com tuberculose, termos verificado baixos níveis de anticorpos fixadores de complemento, fato que não podemos saber se devido a serem infecções localizadas de blastomicose ou à associação com tuberculose.

O caso em que a blastomicose produziu mal de Addison e aqueles em que a mesma apresentou localização nervosa, são aqui referidos principalmente com a finalidade de chamar a atenção que a imunologia pode auxiliar pouco no diagnóstico clínico. Realmente, por se tratar de localizações metastáticas e, na maior parte das vezes, lesões limitadas, não encontramos os anticorpos circulantes em altos níveis. Faz exceção o caso F. V., em que a localização nervosa se verificou quando a moléstia ainda se apresentava em plena atividade, com altos níveis de anticorpos fixadores no sangue,

apresentando também anticorpos fixadores do complemento no liquor. Verificamos por êste caso que a evolução pode ser acompanhada através de reações praticadas no liquor. A grande importância que conferimos à apresentação dessas formas nervosas é a sua freqüência; em cêrca de 300 casos, aqui apresentados, 5 tinham sinais de localização nervosa. Devemos assinalar que, para 60 casos de blastomicose sul-americana, encontra-se 1 com localização nervosa. O diagnóstico é realmente difícil e julgamos que se deve sempre ter em mente a localização metastática no sistema nervoso central, dando-se o devido valor à informação da existência de blastomicose no passado.

Apresentamos, em nossa casuística, 2 casos de blastomicose descobertos através do estudo imunológico, o que vem demonstrar o interesse da imunologia na orientação do diagnóstico.

Maior interesse apresentam os últimos 2 casos que referimos e nos quais chegou-se a diagnóstico de câncer quando o estudo imunológico revelou que era pouco provável a etiologia blastomicótica.

Quanto aos resultados obtidos em familiares de doentes de blastomicose, o estudo foi realizado justamente com a finalidade de comprovar que os resultados seriam negativos. Na realidade, clinicamente não haviam sido descritos casos de contágio inter-humano da blastomicose sul-americana e só poderíamos esperar resposta em anticorpos circulantes em indivíduos que apresentassem sintomas da infecção. Não podemos saber se o contágio se faz sob a forma de blastomicose-infecção. Esta investigação poderá ser feita através da realização de provas intradérmicas, com antígenos padronizados. O caso de blastomicose que encontramos através dêsse estudo, segundo nossa opinião, encontra explicação mais lógica numa possível contaminação a partir da mesma fonte de infecção do que na transmissão inter-humana. Esta verificação de caso de blastomicose em filho de doente poderá, no entanto, sofrer outra interpretação, desde que se demonstre, por outros meios, que o contágio inter-humano existe.

## CONCLUSÕES

O antígeno que empregamos demonstrou-se eficiente em reações de precipitação e de fixação do complemento. Consegue-se boa reprodutibilidade nos resultados quando se trabalha com várias amostras de *Paracoccidoides brasiliensis* na sua obtenção. As curvas de isofixação mostram que êle pode ser titulado facilmente,

empregando-se o método da titulação cruzada, onde são usadas várias diluições do antígeno contra várias diluições de soro positivo.

O antígeno é bom no que diz respeito à conservação, pois suas propriedades antigênicas não se alteram quando mantido em geladeira, em condições estéreis, durante 3 anos.

O *Paracoccidioides brasiliensis* parece ter baixo ou nulo poder imunogênico para o coelho, quando empregado sob forma de células leveduriformes mortas pelo calor.

Verificamos diferenças quanto à capacidade de liberação de "polissacarídeo-antígeno" pelas diversas amostras de *Paracoccidioides brasiliensis*. Essas diferenças são quantitativas.

A associação de duas provas sorológicas — precipitação e fixação do complemento — permitiu-nos revelar anticorpos nos soros de 98,4% dos pacientes de blastomicose sul-americana.

O estudo imunológico de 220 casos de blastomicose sul-americana possibilitou-nos classificar os casos de "blastomicose-doença" em duas formas principais:

- a) blastomicose benigna, que geralmente se apresenta sob forma localizada e que se caracteriza por apresentar baixo teor em anticorpos fixadores do complemento; nossos achados indicam-nos que as precipitinas são os anticorpos que aparecem primeiro e também são os primeiros a desaparecer.
- b) blastomicose grave, moléstia disseminada que clinicamente se apresenta sob a forma crônica progressiva, ou sob forma generalizada e que se caracteriza por apresentar alto teor em anticorpos fixadores do complemento e precipitinas presentes, sempre que a moléstia se encontra em atividade.

O estudo imunológico evolutivo, que fizemos em pacientes de blastomicose, permitiu-nos verificar que geralmente as precipitinas são os primeiros anticorpos que desaparecem da circulação, quando o paciente é tratado eficientemente. Constituem, por outro lado, indicação, às vezes, mais precoce que o aumento do teor em anticorpos fixadores do complemento, de recaída da moléstia, quando reaparecem na circulação.

Os anticorpos fixadores do complemento persistem durante mais tempo na circulação após a cura clínica. Acompanhando a cura clínica, geralmente verificamos a queda no seu teor, sendo raros

os casos em que a baixa no teor é muito lenta e posterior à cura clínica. As recaídas, geralmente, são acompanhadas de elevação significativa no teor em anticorpos fixadores do complemento. São raros os casos em que só reaparecem as precipitinas e aqueles por nós observados foram submetidos a novo tratamento. No estudo evolutivo de caso de blastomicose, quando o título em anticorpos fixadores do complemento fôr superior a 10 (técnica de WADSWORTH, MALTANER & MALTANER) ou as precipitinas estiverem presentes, não se deve interromper o tratamento. Em alguns casos, o título inferior a 5 parece constituir cicatriz sorológica e julgamos que o tratamento poderá ser interrompido quando isto se verificar por mais de 6 meses.

Verificamos a ocorrência de recaídas reveladas unicamente pelo estudo sorológico.

Há raros casos de blastomicose sul-americana nos quais os anticorpos circulantes estão ausentes.

Existem em nossa casuística casos curados clínica e sorologicamente. Pensamos que eles realmente possam existir em maior número, desde que os casos de forma benigna da moléstia constituem a minoria em nosso trabalho.

Nossas pesquisas indicam que a imunologia é de pequena ajuda no diagnóstico de formas localizadas e metastáticas da moléstia, como verificamos nas localizações nervosas e das glândulas supra-renais.

Demonstramos, em alguns casos, o grande valor diagnóstico assumido pelas provas sorológicas, quando interpretadas à luz dos dados clínicos.

Não conseguimos demonstrar, pelo estudo sorológico de familiares de pacientes de blastomicose, o contágio inter-humano da moléstia.

## SUMMARY

### CONTRIBUTION TO THE IMMUNOLOGICAL STUDY OF SOUTH AMERICAN BLASTOMYCOSIS

In the first chapter of the paper a review is made of the literature concerning the immunology of the more important deep mycosis. Types of antigens, immunological reactions used, cross reactions observed and the results supplied by the immunological study are described. In this way, a review of the literature about Coccidioidomycosis, Histoplasmosis, North American Blastomycosis

and South American Blastomycosis is made. Regarding the South American Blastomycosis, suggestions are made to achieve a better knowledge on the immunology of this disease.

In chapter two, the material and methods used in complement fixation and precipitin reactions are described. In this chapter, some findings about the antigen are included. First, a table (table I) with data regarding 22 batches of antigen prepared up to 1959 are presented. The data refer to the strains of *Paracoccidioides brasiliensis*, the days of culturing and the optimal fixing capacity of the antigens with 3 and 6 units (50% hemolysis) of complement.

An experiment on preservation of the antigen is recorded. It can be kept in the ice-box under sterile conditions without preservative for a period of time as long as three years. Under these conditions there is no modification in the properties of the antigen. In this chapter it is also reported an experiment about immunization of rabbits using as antigen the polysaccharide and a suspension of yeast-like cells of *P. brasiliensis*. It was not possible to obtain any antibody in the experiments which were carried out with only two rabbits, and the results have been included in order to call the attention about the difficulty of obtaining hyperimmune serum from these animals. Another experiment recorded in this chapter deals with the possibility of obtaining "polysaccharide-antigen" from each strain employed in the preparation of the antigen (most times 8 strains were used — table I).

In order to make this study, iso-fixation curves were prepared as advised by Almeida in 1956. The protocols of these experiments are given in tables II to XIV and the results are represented in diagrams 1 to 3.

Each one of the eight antigens was obtained from a separate strain of *P. brasiliensis* and it was also tested in the precipitin reactions with a human serum from a patient with South American Blastomycosis. All antigens gave positive results as can be seen in table XV. In this chapter, the principal features of the complement fixation reactions which had been studied in a previous work as well as the technique followed in the precipitin reaction are also mentioned.

In chapter III, the results of precipitin and complement fixation reactions in 220 patients of South American Blastomycosis are presented, each serum was tested by the two kinds of reaction at the same time. The results of complement fixation (Wadsworth,

Maltaner & Maltaner) and of the precipitin reactions in 22 cases of localized forms of South American Blastomycosis are presented. Some cases had had the disease for less than one year (table XVI) and others for more than one year (table XVII) when their blood was collected.

Tables XVIII and XIX show the results observed in the disseminated forms of South American Blastomycosis in 59 patients with less than one year of duration and 107 patients with more than one year of duration before their sera were tested. In table XX, results concerning 32 patients considered clinically cured when their blood was collected are presented.

In table XXI, there are the results of the immunological follow-up of 10 patients with the localized form of South American Blastomycosis who were chosen according to increasing periods of illness duration before collection of the first blood specimen. It can be seen that some of these cases were classified in this group at the beginning of the observation but according to their immunological behavior they were cases of disseminated forms of South American Blastomycosis (e.g. case A.A. in the table XXI).

In table XXII, we have the immunological follow-up of fifteen cases of disseminated forms of the disease chosen according to increasing periods of illness duration before collection of the first blood specimen. In table XXIII, likewise, we have the immunological follow up of seven cases of clinically-cured forms. Some cases in the last three tables had only one serum tested and they were included on account of the period of evolution of the disease and in order to demonstrate the general behavior in each group. In this chapter are also presented the results of the immunological study of 1 case of South American Blastomycosis associated with leprosy, 2 cases associated with tuberculosis, 1 case with Addison's disease, because of the metastatic localization of the illness in the adrenals, 5 cases with metastatic localization of the disease in the central nervous system, 2 cases in which the diagnosis of cancer was made after the immunological examination suggested that they were not cases of South American Blastomycosis and two cases of South American Blastomycosis in which the diagnosis was first made by the immunological data.

Finally, we have the results of an immunological study among 47 relatives of the patients which was made with precipitin and complement fixation reactions in order to show the inter-human transmission (table XXVIII).

Chapter IV records the discussion of the results obtained regarding the antigen employed, the preservation of the antigen and the preparation of antigen from different strains of *Paracoccidioides brasiliensis*. Regarding the patients of South American Blastomycosis, an attempt is made to adjust the results to a very general scheme of the evolution of an infection when a microorganism penetrates the human body. When this happens, the following may occur:

- a) infection without disease
- b) mild infection — generally localized forms
- c) severe illness — disseminated forms

It is emphasized that the author had not a good antigen for making skin tests and that the first of these forms, e.g., blastomycosis infection without disease, has not been demonstrated. Studies made in 1959 by Prof. Lacaz *et alii* suggest that this form exists in the South American Blastomycosis like in other deep mycosis.

Regarding the localized forms of South American Blastomycosis it may be remarked: a) the rarity with which they were observed in this research, only ten per cent; b) the time of appearance of the two kinds of antibody; c) the low titer of the complement-fixing antibody; d) the persistence of the antibody in the sera of the patients after treatment. The precipitin was the first antibody to appear in the blood of the patients and the first to disappear after treatment. Diagram 5 records the immunological evolution of a typical case of this form of South American Blastomycosis.

Regarding the disseminated forms of South American Blastomycosis, the higher titer observed in the complement-fixation reaction may be remarked. These titers may come down with some rapidity after treatment in cases supposed to be of acute disseminated forms, as shown in diagram 6. In other cases, treated with sulphadruugs without improvement, the titer remains high as shown in the diagram 7, where the titer only came down when the patient was subjected to other treatments like sulpham and D<sub>2</sub> vitamin in December, 1957, and Amphotericin B in June, 1958. In this case, clinical and serological relapses could be seen. In other chronic cases, a clinical cure may be achieved without decrease in the titer of fixing antibodies (as we can see in Table XXII — case J. R.). In diagram 8 there is a case of serological relapse during the year of 1957 without symptoms or signs of clinical relapse. Regarding the precipitin in the disseminated forms, it is present when the disease is in activity.

The follow-up of the clinically cured cases shows that the complement-fixing antibody remains in the sera after the treatment, and after precipitin has vanished, as revealed by the high percentage of complement-fixation reaction positive in these cases. A discussion is made of the cases associated with other illnesses, of the cases of metastatic localization in adrenals and central nervous system, and of the investigation in relatives of the patients.

Chapter V records the conclusions of the present work. First, about the antigen used (a polysaccharide from *Paracoccidioides brasiliensis*):

- a) this antigen is good for the precipitin and complement-fixation reactions;
- b) it can be obtained easily using various strains of *Paracoccidioides brasiliensis*;
- c) it can be titrated very well by block titration;
- d) it can be kept in the refrigerator for a period as long as 3 years without any modification in its properties;
- e) the yield of polysaccharide is quantitatively different in different strains of *P. brasiliensis*.

The immunological study of 220 patients of South American Blastomycosis allows the following conclusions:

Using the two kinds of test — precipitin and complement fixation reactions — circulating antibodies may be demonstrated in 98.4% of the patients of South American Blastomycosis. These patients can be classified into two main clinical immunological forms.

- a) mild-blastomycosis, usually of the localized forms and characterized by a low titer in complement-fixing antibody. In these forms the precipitin is the first antibody to appear in the serum of the patients and the first to disappear after treatment;
- b) severe-blastomycosis, clinically manifested as disseminated or generalized forms and immunologically characterized by high titer of complement-fixing antibody and precipitin reaction positive when the illness is in activity.

The immunological follow up showed that the precipitin is the first antibody to disappear in the serum of these patients when they receive a good treatment. On the other hand, the precipitin is the first antibody to reappear in the circulation by the time of the occurrence of relapses of the disease.

The complement-fixing antibody remains for a long time in the blood of the patients clinically cured. In the majority of cases a decrease in the titer of these antibodies can be found at the same time as the clinical improvement. The cases where the titers show a late fall, after some time of clinical improvement, are rare. The clinical relapses are accompanied by a rise in the titer of complement-fixing antibodies. The cases in which only precipitin reappears are rare and some of them have been treated again.

In the evolution of a case when the titer in complement-fixing antibody is higher than 10 (by the technique of Wadsworth, Maltaner and Maltaner), or if the precipitin reaction is positive, the treatment should not be interrupted. In some cases, the titer below 5, when observed over a period of time lasting more than 6 months, may be considered a "serological scar" and the treatment can be interrupted. There are relapses that were characterized only by the serological result without clinical manifestation. Very rare cases of South American Blastomycosis do not present any precipitin or complement-fixing antibodies in the blood.

In this paper, some cases have been reported with clinical and serological cure, and the true number may be higher on account of the very low number (only 10%) of localized forms registered here. The immunological study does not help so much in metastatic localized forms of South American Blastomycosis as in the nervous and adrenals localizations referred in this paper. On the other hand, cases are presented where the immunological study associated with clinical data was of much help in the diagnosis. In the study of the relatives of patients with South American Blastomycosis it was not possible to demonstrate any inter-human transmission by the precipitin and complement fixation reactions.

#### AGRADECIMENTOS

Queremos agradecer aos colegas e amigos que tornaram possível êsse trabalho. Ao nosso mestre Prof. Carlos da Silva Lacaz agradecemos a amizade de sempre, o estímulo e o ambiente de trabalho que nos proporcionou. Nossos agradecimentos aos colegas do Departamento de Microbiologia e Imunologia que sempre se mostraram dispostos a nos auxiliar nesta pesquisa.

Devemos agradecer aos colegas da Clínica de Doenças Tropicais e Infetuosas (Serviço do Prof. João Alves Meira), Drs. Gildo Del Negro, Cecília Magaldi e Vicente Amato Neto; da Clínica Derma-

tológica (Serviço do Prof. João de Aguiar Pupo), Dr. Sebastião de Almeida Prado Sampaio e da Clínica Otorrinolaringológica (Serviço do Prof. Raphael da Nova), Dr. Lamartine de Paiva, pela ajuda na coleta de sangue de doentes de blastomicose. Somos gratos, igualmente, ao Dr. Manoel Caetano Passos Filho, do "Instituto Clemente Ferreira", que nos enviou para contrôlo sorológico pacientes observados naquele Instituto.

Durante a execução do presente trabalho, vários colegas foram consultados e aqui deixamos os nossos agradecimentos ao Prof. Otto Bier, Drs. Octavio A. Germack e Michel Pinkus Rabinovitch, bem como a todos que nos auxiliaram.

Agradecemos ao técnico Victor Salcedo Vega pela dedicada ajuda no preparo dos antígenos; à técnica Ida Mello Sciannaméa, pelo prestimoso auxílio na execução das reações. À Sra. Hercy de Souza Valle, pela dedicada colaboração na parte de datilografia e mimeografia.

Agradecemos o precioso auxílio recebido do Instituto Adolfo Lutz na elaboração do presente trabalho.

## BIBLIOGRAFIA

ALMEIDA, F. & C. S. LACAZ — 1941 — I. Intradermo reação com paracoccidioidina no diagnóstico do granuloma paracoccidióidico. II. A reação de Montenegro no granuloma paracoccidióidico. *Folia Clin. et Biol.* 13: 177-182.

ALMEIDA F. & C. S. LACAZ — 1942 — Valor das intradermo-reações no diagnóstico das micoses. *An. Fac. Med. Univ. São Paulo* 18: 125-136.

ALMEIDA, F., C. S. LACAZ & A. C. CUNHA — 1945 — Intradermo-reação para o diagnóstico da blastomicose sul-americana (granulomatose paracoccidióidica). *Arq. Bras. Med.* 35: 267-272.

ALMEIDA, J. O. — 1956 — Isofixation curves as a method of standardizing quantitative complement fixation tests. *J. Immunol.* 76: 259-263.

ALMEIDA, J. O. — Contribuição para o estudo da reação de fixação do complemento em lepra. Tese de concurso para catedrático de Microbiologia e Imunologia Aplicadas na Faculdade de Higiene e Saúde Pública da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1958.

BASGAL, W. — Contribuição ao estudo das blastomicoses pulmonares. Tese de doutoramento. Rio de Janeiro, Leuzinger, 1931.

BEADENKOPF, W. G. *et alii* — 1949 — Tuberculin, coccidioidin and histoplasmin sensitivity in relation to pulmonary calcifications; a survey among 6.000 students at the University of Chicago. *Pub. Health Rep.* 64: 17-32.

CAMPBELL, C. C. & S. SASLAW — 1948 — The use of yeast phase antigens in a complement fixation test for Histoplasmosis. II. Results with ground antigens. *J. Lab. Clin. Med.* 33: 1207-1211.

CAMPBELL, C. C. & S. SASLAW — 1949 — The use of yeast phase antigens in a complement fixation test for histoplasmosis. III. Preliminary results with human sera. *Pub. Health Rep.* 64: 551-560.

CAMPBELL, C. C. — 1953 — Antigenic fractions of *Histoplasma capsulatum*. *Am. J. Publ. Health* 43: 712-717.

CAMPBELL, C. C. & G. E. BINKLEY — 1953 — Serologic diagnosis with respect to *histoplasmosis*, *coccidioidomycosis* and *blastomycosis* and the problem of cross-reactions. *J. Lab. Clin. Med.* 42: 896-906.

CARVALHO, A. — 1953 — Sobre o emprego da paracoccidioidina na cidade do Rio de Janeiro (Primeiros resultados baseados no estudo de 475 indivíduos). *Rev. Brasil. Tuberc.* 21: 73-82.

CARVALHO, A. — Sobre o uso intradérmico da paracoccidioidina (filtrado e suspensão) como meio auxiliar de diagnóstico na doença de Lutz. Rio de Janeiro, Editorial Sul Americano, 1958.

COHEN, R. — 1949 — Coccidioidomycosis. Cases studies in children. *Arch. Pediat.* 66: 241-265.

CONANT, N. F. *et alii* — Manual of clinical mycology. Philadelphia, W. B. Saunders, 1954.

CROSS, F. W. & A. HOWELL — 1948 — Studies of fungus antigens. II. Preliminary report on the isolation of an immunologically active polysaccharide from histoplasmin. *Publ. Health Rep.* 63: 179-183.

CUNHA, J. C. P. *et alii* — 1959 — Forma linfático-tegumentar da blastomicose sul-americana complicada com disseminação hematogênica do *Paracoccidioides brasiliensis*. Remissão pela Anfotericina B. *Rev. Hosp. Clin.* 14: 279-287.

DEL NEGRO, G. & J. L. FARIA — 1954 — Reação à paracoccidioidina em cobaias. *Rev. Assoc. Med. Brasil.* 1: 156-165.

DICKSON, E. C. & M. A. GIFFORD — 1938 — Coccidioides infection (Coccidioidomycosis). II. The primary type of infection. *Arch. Int. Med.* 62: 853-871.

DOUAT, N. E. & V. M. DIAS — 1958 — Intradermorreacções de paracoccidioidina, coccidioidina e histoplasmina. Resultados dos testes em 300 indivíduos. *Rev. Brasil. Tuberc.* 26: 663-668.

DYSON, J. E. & E. E. EVANS — 1954 — Skin test antigens from yeast phase cultures of *Blastomyces dermatitidis* and *Histoplasma capsulatum*. *Univ. Michigan M. Bull.* 20: 53-61.

EDWARDS, L. B., I. LEWIS & C. E. PALMER — 1948 — Studies of pulmonary findings and antigen sensitivity among student nurses. III. Pulmonary infiltrates and mediastinal adenopathy observed among student nurses at the beginning of training. *Publ. Health Rep.* 63: 1569.

EDWARDS, P. Q. & C. E. PALMER — 1957 — Prevalence of sensitivity to coccidioidin, with special reference to specific and nonspecific reactions to coccidioidin and to histoplasmin. *Dis. Chest* 31: 3-28.

EMMONS, C. W., B. J. OLSON & W. W. ELDRIDGE — 1945 — Studies of the role of fungi in pulmonary disease. I. Cross reactions of histoplasmin. *Pub. Health Rep.* 60: 1383-1394.

FAYA NETTO, C. — 1955 — Estudos quantitativos sobre a fixação do complemento na blastomicose sul-americana, com antígeno polissacarídico. *Arq. Cir. Clín. Exper.* 18: 197-254.

FAYA NETTO, C., R. G. FERRI & C. S. LACAZ — 1959 — Proteinograma e algumas "provas da fase aguda do sôro" na blastomicose sul-americana. Estudo comparativo com as reações de fixação do complemento e de precipitação. *Med. Cir. Farm.* 277: 157-163.

FONSECA, O. & A. E. A. LEÃO — 1927 — Réaction cutanée spécifique avec le filtrat de culture de *Coccidioides immitis*. *Compt. Rend. Soc. Biol.* 97: 1796-1797.

FONSECA, O. & A. E. A. LEÃO — 1927 — Déviation du complément dans le granulome coccidioidal. Sensibilité du filtrat de culture de *Coccidioides immitis*, employé comme antigène. *Compt. Rend. Sec. Biol.* 97: 1776-1777.

FRIEDMAN, L. & N. F. CONANT — 1953 — Immunologic studies on the etiologic agents of North and South American blastomycosis. I. Comparison of hypersensitivity reactions. *Mycopathologia* 6: 310-316.

FRIEDMAN, L. & N. F. CONANT — 1953 — Immunologic studies on the etiologic agents of North and South American blastomycosis. II. Comparison of serologic reactions. *Mycopathologia* 6: 317-324.

FURCOLOW, M. L., M. E. EMGE & I. L. BUNNEL — 1948 — Depression of tuberculin and histoplasmin sensitivity associated with critical illness. *Pub. Health Rep.* 63: 1290.

FURCOLOW, M. L. & J. T. GRAYSTON — Non tuberculous chest diseases. Occurrence of histoplasmosis in epidemics. Transactions of the Forty-eight Annual Meeting of the National Tuberculosis Association, 1-9, 1952.

FURCOLOW, M. L., R. W. MENGES & H. W. LARSH — 1955 — An epidemic of histoplasmosis involving man and animals. *An. Int. Med.* 43: 173-181.

FURCOLOW, M. L. — 1956 — The clinical diagnosis of histoplasmosis. *Postgrad. Med.* 20: 349-364.

FURCOLOW, M. L. — 1958 — Recent studies on the epidemiology of histoplasmosis. *Ann. New York Acad. Sc.* 72: 127-164.

GOMES, J. M. & L. ASSUMPTÃO — 1924 — Em torno do gênero *Coccidioides*. *Ann. Paul. Med. Cir.* 15: 49-61.

GRAYSTON, J. T. — 1952 — A study of the complement fixation reaction in histoplasmosis. *J. Lab. Clin. Med.* 40: 90-101.

HARRIS, J. S. *et alii* — 1957 — North American blastomycosis in an epidemic area. *Pub. Health Rep.* 72: 95-100.

HASSID, W. Z., E. E. BAKER & R. M. MCCREADY — 1943 — An immunologically active polysaccharide produced by *Coccidioides immitis* Rixford and Gilchrist. *J. Biol. Chem.* 149: 303-311.

HAZEN, E. L. & E. D. TAHLER — Quantitative complement-fixation tests for evidence of histoplasmosis and blastomycosis. (*in An. Rep. Div. Lab. Res. Albany, N. Y., State Dept. Health, 1953, p. 73-4*).

HAZEN, E. L. & C. H. GREENE — Quantitative complement-fixation tests for evidence of histoplasmosis and blastomycosis. (*in An. Rep. Div. Lab. Res. Albany, N. Y., State Dept. Health, 1956, p. 97*).

HAZEN, E. L. & C. H. GREENE — Quantitative complement-fixation tests for evidence of histoplasmosis and blastomycosis. (*in* An. Rep. Div. Lab. Res. Albany, N. Y., State Dept. Health, 1957, p. 75).

HOUNIE, P. & R. G. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE — 1957 — Encuesta sobre la sensibilidad al agente de la blastomicosis sudamericana. An. Fac. Med. Montevideo 42: 27-32.

LAZOFFSKY, N. A., J. B. FISCHER & J. J. HAMVAS — 1957 — Studies on the antigenic structure of *Histoplasma capsulatum*. Canad. J. Microbiol. 3: 975-85.

LACAZ, C. S. — 1945 — Contribuição brasileira para o estudo da blastomicose sul-americana (granulomatose paracoccidióidica). Hospital (Rio), 28: 249-60.

LACAZ, C. S. — Contribuição para o estudo dos actinomicetos produtores de micetomas. Tese de livre-docência. São Paulo, Tip. Rossohillo, 1945.

LACAZ, C. S. — 1948 — Blastomicose sul-americana. Reações intradérmicas com paracoccidioidina, coccidioidina e blastomicetina. Rev. Hosp. Clin. 3: 11-18.

LACAZ, C. S. — 1949 — Novos dados em relação à blastomicose sul-americana e seu agente etiológico. Rev. Med. Cir. São Paulo 9: 303-41.

LACAZ, C. S. — 1951 — Lesões pulmonares na blastomicose sul-americana. Inquérito preliminar realizado com paracoccidioidina. Hospital (Rio) 39: 405-422.

LACAZ, C. S. *et alii* — 1955 — Histoplasose na infância. Comentários sobre um caso. Revisão da literatura nacional. Novos dados sobre a histoplasmina em nosso meio. Rev. Paulista Med. 47: 495-509.

LACAZ, C. S. — Manual de micologia médica. 2.<sup>a</sup> ed. São Paulo, Irmãos Dupont, 1956.

LACAZ, C. S. *et alii* — Contribuição para o estudo da "blastomicose-infecção". Inquérito com a paracoccidioidina. Estudo sorológico e clínico-radiológico dos paracoccidioidino-positivos. Em publicação.

LEHAN, P. H. & M. L. FURCOLOW — 1957 — Epidemic histoplasmosis. J. Chron. Dis. 5: 489-503.

MACKINNON, J. E., R. C. ARTAGAVEYTIA-ALLENDE & L. ARROYO — 1953 — Sobre la especificidad de la intradermorreaccion con paracoccidioidina. An. Fac. Med. Montevideo 38: 363-82.

MARTIN, D. S. — 1935 — Complement fixation in blastomycosis. J. Infect. Dis. 57: 291-5.

MARTIN, D. S., D. T. SMITH & N. C. DURHAN — 1936 — The laboratory diagnosis of blastomycosis. J. Lab. Clin. Med. 21: 1289-96.

MARTIN, D. S. & D. T. SMITH — 1939 — Blastomycosis (American blastomycosis, Gilchrist's disease). I. A review of the literature. Am. Rev. Tuberc. 39: 275-304.

MARTIN, D. S. & D. T. SMITH — 1939 — Blastomycosis (American blastomycosis, Gilchrist's disease). II. A report of thirteen new cases. Am. Rev. Tuberc. 39: 488-515.

MARTIN, D. S. — 1953 — Serologic studies on North American blastomycosis. Studies with soluble antigens from untreated and sonic-treated yeast-phase cells of *Blastomyces dermatitidis*. J. Immunol. 71: 192-201.

MOSES, A. — 1916 — Fixação do complemento na blastomicose. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 8: 68-70.

NORDÉN, A. — 1949 — Agglutination of sheep's erythrocytes sensitized with histoplasmin. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 70: 218-220.

NORDÉN, A. — 1951 — Sporotrichosis. Clinical and laboratory features and a serological study in experimental animals and humans. Acta Path. e Microb. Scandinav. (suppl.) 39.

PAPPAGIANIS, D. & G. S. KOBAYASHI — 1958 — Production of extracellular polysaccharide in cultures of *Coccidioides immitis*. Mycologia 50: 229-38.

PATES, A. L. — 1948 — Precipitin reactions in experimental histoplasmosis and blastomycosis. Science 108: 383-5.

PECK, R. L., D. S. MARTIN & C. R. HAUZER — 1940 — Polysaccharides of blastomyces dermatitidis. J. Immunol. 38: 449-55.

PRIOR, J. A. & S. SASLAW — 1952 — Effect of repeated histoplasmin skin tests on skin reactivity and collodion agglutination. Am. Rev. Tuberc. 66: 588-93.

RAPPORT, M. M. & L. GRAFF — 1957 — Immunochemical analysis based on complement fixation. Ann. New York Acad. Sc. 69: 608-32.

SALVIN, S. B. — 1947 — Complement fixation studies in experimental histoplasmosis. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 66: 342-45.

SALVIN, S. B. — 1949 — The serologic relationship of fungus antigens. J. Lab. Clin. Med. 34: 1096-1104.

SALVIN, S. B. — 1950 — Quantitative studies on the serologic relationship of fungi. J. Immunol. 65: 617-26.

SALVIN, S. B. & M. L. FURCOLOW — 1954 — Precipitins in human histoplasmosis. J. Lab. Clin. Med. 43: 259-74.

SALVIN, S. B. *et alii* — 1954 — Influence of repeated histoplasmin skin tests on precipitins and complement-fixing antibodies. J. Lab. Clin. Med. 44: 56-62.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1948 — A method for demonstrating antibodies in rabbit sera against histoplasmin by collodion agglutination technic. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 68: 559-62.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1948 — The use of yeast phase antigens in a complement fixation test for histoplasmosis. I. Preliminary results with rabbit sera. J. Lab. Clin. Med. 33: 811-18.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1949 — A collodion agglutination test for histoplasmosis. Public. Health Rep. 64: 424-9.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1950 — Serologic studies in histoplasmosis. Am. J. Public Health 40: 427-35.

SASLAW, S. & C. C. CAMPBELL — 1953 — Effect of histoplasmin skin testing on serologic results. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 82: 689-91.

SCHUBERT, J. *et alii* — 1953 — Variation in complement fixation antigen production by different strains of *Histoplasma capsulatum* grown on two media. J. Lab. Clin. Med. 41: 91-7.

SCHUBERT, J. H. & L. AJELLO — 1957 — Variation in complement fixation antigenicity of different yeast phase strains of *Histoplasma capsulatum*. J. Lab. Clin. Med. 50: 304-7.

SCHWARZ, J. & G. L. BAUM — 1952 — Results of skin tests in contact of blastomycotic patients. J. Invest. Derm. 18: 3-4.

SCHWARZ, J. & M. L. FURCOLOW — 1955 — Some epidemiologic factors and diagnostic tests in blastomycosis, coccidioidomycosis and histoplasmosis. Am. J. Clin. Path. 25: 261-5.

SILVA, N. N. — Intradermo-reação para diagnóstico da blastomicose de Lutz. Segunda Reunião Anual dos Dermato-sifilógrafos Brasileiros, 13/14, 1945.

SMITH, C. E. — 1943 — Coccidioidomycosis. Med. Clin. North America 27: 790-807.

SMITH, C. E. *et alii* — 1948 — The use of coccidioidin. Am. Rev. Tuberc. 57: 330-60.

SMITH, C. E. *et alii* — 1949 — Histoplasmin sensitivity and coccidioidal infection. I. Occurrence of cross-reactions. Am. J. Pub. Health 39: 722-36.

SMITH, C. E. *et alii* — 1950 — Serological tests in the diagnosis and prognosis of coccidioidomycosis. Am. J. Hyg. 52: 1-21.

SMITH, D. T. — 1949 — Immunologic types of blastomycosis. A report on 40 cases. Ann. Int. Med. 31: 463-9.

SORENSEN, L. J. & E. E. EVANS — 1954 — Antigenic fractions specific for *Histoplasma capsulatum* in the complement fixation reaction. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87: 339-41.

STEIN, G. J. & D. VAN NGU — 1950 — A quantitative complement fixation test: titration of luetic sera by unit of 50 per cent hemolysis. J. Immunol. 65: 17-37.

STEWART, R. A. — Coccidioidomycosis. (in R. D. G. Simons, Medical Mycology, Amsterdam, Elsevier Publishing Co., 1954).

WADSWORTH, A. B. — Standard methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947.

WILSON, J. W., C. E. SMITH & O. A. PLUMKETT — 1953 — Primary cutaneous coccidioidomycosis. The criteria for diagnosis and report of a case. California Med. 79: 233-9.

WILSON *et alii* — 1955 — Primary cutaneous North American blastomycosis. A. M. A. Arch. Dermat. 71: 39-45.

WILSON, J. W. — Clinic and immunologic aspects of fungous diseases. Springfield, Mass, C. C. Thomas, 1957.