

ESTUDOS IMUNOQUÍMICOS NA HANSENÍASE

I - ELETRO E IMUNOELETROFORESE DAS PROTEÍNAS SÉRICAS. TENTATIVA DE ASSOCIAÇÃO COM A REAÇÃO DE RUBINO

O. P. SILVA (*)
R. G. FERRI (**)
N. MORAES (***)
A. L. V. MARQUES (****)

RESUMO — Foi feita uma tentativa para determinar se pacientes de hanseníase, com reação de Rubino positiva, exibem características imunológicas que possam diferenciá-los daqueles com reação negativa. Observou-se, pela eletroforese, que os pacientes Rubino negativos (virchovianos e tuberculóides) apresentavam níveis de alfa₂ globulina maiores que os pacientes Rubino positivos (virchovianos) e os indivíduos normais. Os níveis de beta globulina estavam diminuídos nos Rubino positivos e aumentados nos virchovianos Rubino negativos. Pela imunoeletroforese houve resultados semelhantes para os dois grupos virchovianos : aumento constante de IgG e IgM e eventual de IgA.

Termos indice: Hanseníase. Imunologia. Reação de Rubino. Eletroforese. Imuno-eletroforese.

Key words: Hanseniasis. Immunology. Rubino's reaction. Electrophoresis. Immuno-electrophoresis.

(*) Prof. Assist. Doutor da Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Depto. de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

(**) Prof. Livre-Docente do Depto. de Microbiologia e Imunologia do ICB-USP; Chefe do Centro de Pesquisas Imunoquímicas do ICE-USP.

(***) Prof. Titular do Depto. de Odontologia Social da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP, responsável pela análise estatística.

(****) Prof. Colaborador. Responsável pela Disciplina de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

INTRODUÇÃO

Em 1926 Rubino (20), ao realizar trabalho sobre fixação eventual do complemento para sífilis, observou, pela primeira vez, a capacidade do soro de hansenianos de aglutino-sedimentar rapidamente hemácias formoladas de carneiro. A especificidade da reação, referida por vários autores, foi confirmada por Bier & Arnold (4) que observaram apenas 0,1% de inespecificidade em 945 controles. Isso desperta interesse imediato, uma vez que, embora haja uma soma enorme de dados relativos à imunologia da hanseníase, não há correlação direta entre eles e algum traço específico da doença.

Em vista da característica única demonstrada pela reação de Rubino, procuramos estudar as frações eletroforéticas e o comportamento imunoeletroforético do soro de doentes sob tratamento no Hospital "Lauro de Souza Lima" (ex-Sanatório Aimorés), de Bauru, classificando-os primeiramente em Rubino positivos e Rubino negativos, a fim de procurar uma possível correlação entre a propriedade de promover a aglutinação de hemácias formoladas de carneiro e variações verificáveis por eletro e imunoeletroforese. O presente trabalho é o primeiro de uma série, envolvendo estudos imunoquímicos e a reação de Rubino, utilizando a mesma amostra de pacientes. Nossa intenção, assim como a de Curban (6), foi a de estudar a reação, não como simples instrumento diagnóstico, mas sim, como um campo inexplorado que pode trazer alguma contribuição à compreensão do comportamento imunológico do doente de hanseníase.

MATERIAL E MÉTODOS

Soros. Analisamos 76 soros de hansenianos virchovianos e tuberculóides, os primeiros divididos em 2 grupos de 30 pacientes cada um, classificados em Rubino positivos e negativos, constituindo os últimos um único grupo de 16 pacientes Rubino negativos. Esta classificação foi feita com base na reação preconizada por Rubino (21) em 1931: feita a colheita do sangue, após a retração do coágulo removíamos o soro e centrifugávamos a 1500 rpm, durante 15 minutos. Do soro obtido distribuíamos 2 ml em tubo de ensaio que era mantido em geladeira até a execução da reação de Rubino (dentro de 48 horas da colheita) e utilizávamos o restante para outras provas laboratoriais. Essas alíquotas eram mantidas a -20°C até o momento do uso. Como controles utilizamos 35 soros normais de doadores de sangue do Hospital do Servidor Público Estadual "Francisco Morato de Oliveira", de São Paulo.

Todos os pacientes encontravam-se, à época do exame sorológico, em tratamento ambulatorial e exibiam lesões em atividade. A média da faixa etária do grupo virchoviano Rubino positivo foi de 45,5 anos, a do grupo virchoviano Rubino negativo, de 45,9 anos e a do grupo tuberculóide, de 36,4 anos. As porcentagens de indivíduos do sexo masculino foram de 63%, 80% e 56,2%, para os três grupos, respectivamente. Foi idêntico o número de pacientes que já apresentaram surto reacional tipo eritema nodoso nos dois grupos virchovianos (63%).

Dosagem de proteínas totais. Determinamos as proteínas totais pela reação do biureto, segundo o

Estudo imunológico na hanseníase (I)

método de Gornall et al. (8), com leitura no espectrofotômetro "Coleman Jr.", em 540 mm.

Eletroforese. Realizamos a eletroforese sobre acetato de celulose de Kohn (12), modificada por Vaz et al. (27), no equipamento "Mikrophor" Boskamp e a leitura, no medidor de extinção e integrador conjugados, modelo EI-3, Zeiss.

Imunoeletroforese. Executamos a imunoeletroforese de Grabar & Williams (9), pelo micrométodo descrito por Ferri & Cossermelli (7) adaptado ao equipamento "Mikrophor" Boskamp.

RESULTADOS

Eletroforese. As Tabelas I e II dão a média, o desvio padrão e o erro padrão do protidograma dos soros usados como controles e dos grupos de hansenianos estudados. Como, porém, a maior parte das variáveis estudadas apresentou distribuições onde a hipótese de normalidade seria uma aproximação demasiado grosseira, aplicamos testes não paramétricos na análise dos resultados.

Para comparação de cada fração eletroforética em g/100 ml e percentual relativo, entre o grupo normal e os três grupos de hansenianos, utilizamos o teste de Mann-Whitney (24) (Tabela III). Encontramos diferenças significantes nos três grupos. Com relação às proteínas totais, nos dois grupos virchovianos ; com relação às frações albumina e gamaglobu-

Tina (g/100 ml e %R), nos três grupos; alfa₂ globulina (g/100 ml e %R), nos grupos Rubino negativos; beta globulina (g/100 ml), nos virchovianos Rubino negativos e, em percentual relativo, nos virchovianos Rubino positivos.

Para comparação dos mesmos valores, entre os três grupos de pacientes, utilizamos o modelo de análise de variância a 1 critério de Kruskal-Wallis (24). Conforme se verifica pelos resultados da tabela IV, os três grupos diferem entre si com relação às frações alfa₂ globulina (%R), beta e gamaglobulinas (g/100 ml e %R). A fim de determinar se essas diferenças significastes procediam de um comportamento desigual dos grupos virchovianos, fizemos a comparação entre ambos, através do teste de Mann-Whitney. Observamos que os mesmos diferiam significativamente apenas com relação à alfa₂ (%R) e beta globulinas (g/100 ml e %R).

Imunoeletroforese. Os resultados da imunoeletroforese são dados em porcentagens de soros que apresentaram linhas de precipitação na região das imunoglobulinas, com intensidade igual a dos soros normais (Tabela V). Quando comparamos essas porcentagens através do teste das proporções aplicado aos grupos de pacientes 2 a 2 (Tabela VI), não detectamos diferenças entre os grupos virchovianos, mas sim, entre estes e o grupo tuberculóide nas imunoglobulinas G e M (esta última apenas para o grupo Rubino positivo).

T A B E L A I
 Protidograma de indivíduos normais e hansenianos
 (percentual relativo)

Frações	Normais		Virchowianos Rubino positivos		Virchowianos Rubino negativos		Tuberculóides Rubino negativos	
	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão
Pré-albumina	1,100	0,591 0,100	1,016	0,359 0,066	0,983	0,445 0,081	0,969	0,464 0,116
Albumina	62,257	3,547 0,599	51,467	8,400 1,534	51,100	7,800 1,424	56,469	5,557 1,389
Alfa ₁	2,600	0,715 0,121	2,367	0,691 0,124	2,467	0,754 0,138	2,750	0,876 0,219
Alfa ₂	6,657	1,653 0,279	6,633	2,185 0,399	7,417	1,582 0,289	7,594	1,255 0,314
Beta	9,471	1,728 0,292	8,483	2,568 0,469	9,783	1,882 0,344	9,563	1,825 0,456
Gama	17,914	2,238 0,378	30,033	8,322 1,519	28,250	7,386 1,348	22,656	6,185 1,546

T A B E L A I I
 Protidograma de indivíduos normais e hansenianos
 (g/100ml)

Frações	Normais		Virchowianos Rubino positivos		Virchowianos Rubino negativos		Tuberculóides Rubino negativos	
	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão	Média	Desvio padrão Erro padrão
Proteínas totais	7,337	0,556 0,094	7,953	0,817 0,149	7,837	0,869 0,159	7,269	1,280 0,320
Pré-albumina	0,080	0,044 0,007	0,081	0,030 0,005	0,076	0,035 0,006	0,068	0,031 0,008
Albumina	4,562	0,487 0,082	4,055	0,521 0,095	3,970	0,528 0,096	4,094	0,761 0,190
Alfa ₁	0,193	0,053 0,009	0,188	0,056 0,010	0,194	0,065 0,012	0,203	0,078 0,019
Alfa ₂	0,486	0,115 0,019	0,529	0,190 0,035	0,584	0,147 0,027	0,551	0,131 0,033
Beta	0,693	0,113 0,019	0,676	0,223 0,041	0,765	0,169 0,031	0,698	0,191 0,048
Gama	1,323	0,214 0,036	2,425	0,815 0,149	2,248	0,799 0,146	1,655	0,592 0,148

Estudo imunológico na hanseníase (I)

TABELA III

Eletroforese

Comparação dos valores em g/100 ml e em % relativa de cada fração entre o grupo normal e os grupos de hansenianos, utilizando o teste de Mann-Whitney

Eletroforese	Virchoviano Rubino positivo		Virchoviano Rubino negativo		Tuberculóide Rubino negativo	
	g/100ml	%R	g/100ml	%R	g/100ml	%R
Proteína total	3,306*	—	2,369*	—	0,591	—
Pré-albumina	0,811	—0,701	—0,073	—0,489	—1,217	—0,895
Albumina	—3,895*	—5,413*	—4,120*	—5,896*	—2,223*	—3,558*
Alfa ₁	—0,212	—1,225	—0,046	—0,838	0,519	0,559
Alfa ₂	0,119	—0,630	2,680*	1,833*	1,788*	2,109*
Beta	—1,568	—2,946*	1,910*	1,043	0,285	0,318
Gama	5,989*	6,576*	6,126*	6,364*	2,153*	2,942*

* Significante

Valor crítico de $z = 1,64$

TABELA IV

Comparação dos valores de cada fração, em g/100 ml e %R, entre os três grupos de pacientes, através do teste de Kruskal-Wallis

FRAÇÕES	g/100 ml	% R
(Proteína total)	(H = 2,592)	—
Pré-albumina	H = 2,034	H = 0,751
Albumina	H = 1,383	H = 5,300
Alfa ₁	H = 0,428	H = 2,175
Alfa ₂	H = 4,028	H = 7,404*
Beta	H = 6,692*	H = 10,723*
Gama	H = 11,854*	H = 9,522*

* Significante. Valor crítico para H = 5,99 (H tem distribuição χ^2 com dois graus de liberdade)

TABELA V

Imunoeletroforese

Resultados em porcentagem do número de pacientes com níveis normais de imunoglobulinas no soro

Grupos	N.º de casos	IgG		IgA		IgM	
		normal	%	normal	%	normal	%
V. Rubino (+)	30	6	20	24	80	12	40
V. Rubino (—)	30	7	23	25	83	19	63
T. Rubino (—)	16	10	62	16	100	12	75

TABELA VI

Comparação das porcentagens de normalidade das imunoglobulinas entre os três grupos de pacientes

Grupos	N.º de casos	IgG	IgA	IgM
V. Rubino (+)/V. Rubino (—)	30/30	0,283	0,299	1,782
V. Rubino (—)/T. Rubino (—)	30/16	2,647*	1,749	0,825
V. Rubino (+)/T. Rubino (—)	30/16	2,891*	1,915	2,263*

* Significante

Valor crítico de $z = 1,96$

DISCUSSÃO

Antes do advento da eletroforese, e mesmo após, através de fracionamento salino, diversos autores demonstraram a existência de um desequilíbrio na síntese das proteínas séricas na hanseníase, desequilíbrio esse que se traduzia por aumento da fração globulina e inversão na relação albumina/globulina, podendo as proteínas totais apresentar-se normais ou aumentadas, notadamente na forma virchoviana. Após o primeiro trabalho de eletroforese realizado por Seibert & Nelson (22), com soros de 3 virchovianos. demonstrando aumento das alfa e gamaglobulinas e diminuição da albumina, foram publicados vários outros mostrando variações nas diferentes frações eletroforéticas em soros de hansenianos. Mesmo com a divergência dos resultados, os autores são concordes em que a hanseníase virchoviana mostra diferenças do normal mais marcantes que a tuberculóide, e que não existe um proteinograma eletroforético característico representando as diversas formas e estádios da hanseníase.

Em nosso estudo, quando correlacionamos os valores das frações eletroforéticas referentes aos grupos de hansenianos com os obtidos para os indivíduos normais (Tabela III), notamos um comportamento desigual, exceção feita à hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia, presentes nos três grupos de hansenianos, porém, com intensidade variável (mais intensas nos grupos virchovianos).

A hipoalbuminemia, citada por vários autores tanto na hanseníase virchoviana como na tuberculóide, está relacionada, segundo Neil & Dewar (19), com a severidade da doença. Muelling *et al.* (18) associaram valores muito baixos de albumina, com amiloidose renal. Por outro lado, estando os anticorpos relacionados principalmente com a fração gamaglobulina, compreende-se a hipergamaglobulinemia verificada com maior intensidade na hanseníase virchoviana, quando se reporta ao fato de que nessa forma da doença ocorre a persistência de número relativamente grande de bacilos, por longo período de tempo no organismo, estimulando a resposta humoral, o que não ocorre na forma tuberculóide. Não

está excluída a hipótese desses anticorpos existirem na circulação combinados com antígenos micobacterianos, pois que há evidências indiretas da presença no sangue de virchovianos, de complexos Ag-Ac (17). Almeida (1), estudando títulos de anticorpos fixadores do complemento para Ag do bacilo da tuberculose, em soros de virchovianos, durante 15 meses, concluiu que a variação por ele observada só poderia ser explicada pela fixação do complemento "in vivo", devido à formação de complexos imunes circulantes.

O grupo virchoviano Rubino positivo, exceto pela diminuição da beta globulina, expressa em valor relativo, foi o que mais se aproximou do quadro protéico da hanseníase virchoviana citado pela maioria dos autores, com hiperproteinemia, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia. A hiperproteinemia, também encontrada nos virchovianos Rubino negativos, é um quadro comum em virchovianos. Uyguanco *et al.* (26), através de exames eletroforéticos seriados de pacientes tratados com sulfonas, observaram que ocorria diminuição das proteínas totais do soro com o tempo, mas que estas raramente voltavam ao normal. Quanto à beta globulina, Jardin & Beytout (11), que observaram a mesma diminuição, atribuíram-na ao aumento muito intenso de gamaglobulina.

O grupo virchoviano Rubino negativo diferiu do anterior por apresentar aumento de alfa₂ e beta globulinas. Como na análise pelo teste de Mann-Whitney não conseguimos estabelecer diferenças entre os grupos virchovianos Rubino positivo e negativo, para a fração gamaglobulina, fomos levados a crer que a diferença significaste

observada através do teste de Kruskal-Wallis, com relação à mesma (Tabela IV), provinha dos resultados do grupo tuberculóide, cuja hipergamaglobulinemia é significativamente menor. O aumento de alfa₂ foi mencionado por vários autores na hanseníase virchoviana, e por uns poucos, na hanseníase tuberculóide. Aru (2) referiu-se ao aumento freqüente de alfa₂ nas formas graves dos dois tipos de hanseníase. O aumento de alfa₂, que segundo Tarabini (25) é muito acentuado nos casos com síndrome nefrótica, pode indicar destruição tecidual (15) e tuberculose concomitante à hanseníase (3). O aumento de beta em virchovianos é maior, segundo Kono *et al.* (13), nos estados reacionais, tendo sido observado por Tarabini (25), em casos complicados por nefrose. Para Mauzé & Arnaud (16), o aumento de beta e alfa₂, concomitante ou não, indica parasitismo intestinal ou sangüíneo associado.

O modelo eletroforético apresentado pelo grupo tuberculóide com hipoalbuminemia, hiper-alfa₂-globulinemia e hipergamaglobulinemia foi observado em tuberculóides por Serié & Schaller (23).

Por imunoeletroforese foi difícil observar aumento sensível de IgA, como fora mencionado por Lim & Fusaro (14) em soros de pacientes não tratados. Na maior parte das vezes a leitura dessa imunoglobulina foi tida como normal.

O aumento mais constantemente observado foi o da IgG, e a seguir, o da IgM para todos os grupos (Tabela V), sendo menor a variação no grupo tuberculóide. Nossos dados se aproximam daqueles de Bonomo *et al.* (5) para hansenianos virchovianos e tuberculóides.

Embora a imunoelctroforese não tenha permitido estabelecer uma diferenciação quantitativa segura entre os grupos, possibilitou-nos verificar o aumento freqüente da fração α_2 (p) em todos eles, e o aparecimento, em alguns casos, de uma linha suplementar na região da IgM, que acreditamos corresponder à gama \times ($\gamma\times$), nome dado por Heremans (10) a uma linha de precipitação ausente nos soros normais (pelas técnicas comuns de verificação) e observada em soros de muitas doenças inflamatórias e neoplásicas.

Nossos dados não nos permitem concluir sobre uma relação entre a positividade da reação de Rubino e maior deficiência imunológica dos virchowianos que a apresentam e, em conseqüência, um prognóstico mais sombrio para os mesmos. Evidenciam, porém, diferenças, entre os grupos estudados, que só poderão ser explicadas através de estudos eletroforéticos seqüenciais, alicerçados na observação clínica do mesmo grupo de pacientes.

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital "Lauro de Souza Lima", de Bauru, nas pessoas do seu Diretor, Dr. Oswaldo Cruz e Diretor Clínico, Dr. Diltor V. A. Opromolla, pela inestimável colaboração prestada na seleção dos pacientes.

SUMMARY

IMMUNOCHEMICAL STUDIES ON LEPROSY. I. ELECTROPHORESIS AND IMMUNOELECTROPHORESIS OF SERUM PROTEINS. TENTATIVE ASSOCIATION TO RUBINO'S REACTION

It was attempted to establish if leprosy patients with positive Rubino's reaction would display immunological characteristics that could distinguish them from those with negative Rubino's reaction. By electrophoresis, Rubino-negative patients (virchowian and tuberculoid) showed higher levels of α_2 globulin than Rubino-positi-

tive patients Virchowian and normal individuals. Beta globulin levels were decreased in Rubino-positive and increased in Rubino-negative Virchowian patients. By immunoelectrophoresis similar results for the two lepromatous groups: constant increase of IgG and IgM and unfrequent raise of IgA were found.

REFERENCIAS

1. ALMEIDA, J. O. The meaning of antibody titer in leprosy determined by complement fixation with antigens prepared from tubercle bacilli. In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE LEPROLOGIA, 8.º, Rio de Janeiro 1963, *anais*. Rio de Janeiro, Serviço Nacional da Lepra, 1963. v. 3, p. 263-275.
2. ARU, L Il quadro sieroproteico nella lepra. *Arch. Ital. Sei. Med. Trop. Parasit.*, 89(8):527-542, 1958.
3. BENHAMOU, E.; FERRAND, B.; SORREL, A.; CHICHE, J. C. Les controles biologiques du traitement des lépreux. *Presse Méd.*, 64(76):17291732, 1956.
4. BIER, O. & ARNOLD, K. Estudos sobre a sorologia da lepra. I. Sobre a especificidade e a sensibilidade da reação de Rubino. Pesquisas sobre o mecanismo da reação. *Folia Clin. Biol.*, 7(1):1-8, 1935.

Estudo imunoquímico na hanseníase (I)

5. BONOMO, L.; DAMMACCO, F.; GILLARDI, U. Hypergammaglobulinemia, secondary macroglobulinemia and paraproteinemia in leprosy. *Int. J. Leprosy*, 37(3): 280-287, 1969.
6. CURBAN, G. V. Contribuição para o estudo da reação de Rubino. *Rev. Bras. Leprol.*, 30(4) :179-216, 1962.
7. FERRI, R. G. & COSSERMELLI, W. Analyse immuno-électrophorétique micro et macro méthodes. *Rev. Franç. Étud. Clin. Biol.*, 9:134-138, 1964.
8. GORNALL, A. G.; BARDAWILL, C. J.; DAVID, M. M. J. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J. Biol. Chem.*, 177:751766, 1949.
9. GRABAR, P. & WILLIAMS, C. A. Méthode permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin. *Biochim. Biophys. Acta*, 10:193-194, 1953.
10. HEREMANS, J. R. Immunochemical studies on protein pathology. The immunoglobulin concept. *Clin. Chim. Acta*, 4:639-646, 1959.
11. JARDIN, C. & BEYTOUT, D. Etude des protéines sériques du Soudanais hansenien par microélectrophorèse. *Méd. Trop.*, 20:81-101, 1960.
12. KOHN, J. A cellulose acetate supporting medium for zone electrophoresis. *Clin. Chim. Acta*, 2:297-303, 1957.
13. KONG, M.; TSUGAMI, H.; SAKURAI, H. On serum protein components and leucocyte percentage of erythema nodosum leprosum. *Leprosy*, 21:98, 1952.
14. LIM, S. D. & FUSARO, R. M. Leprosy. β_{2A} and β_{2m} immunoglobulins in leprosy sera. *Arch. Derm.*, 89 (1) :86-88, 1964.
15. MASANTI, J. G. Proteínas séricas en la lepra. Modificaciones en las diferentes formas clínicas, en la amiloidosis y acción de los glucocorticóides. *Leprologia*, 4 (3) : 143-152, 1959.
16. MAUZE, J. & ARNAUD, G. L'électrophorèse du serum de lépreux. *Int. J. Leprosy*, 22(1) :55-60, 1954.
17. MORAN, C. J.; TURK, J. L.; RYDER, G.; WATERS, M. F. R. Evidence for circulating immune complexes in lepromatous leprosy. *Lancet*, 2:572-573, 1972.
18. MUELLING JR., R. J.; GOETZ, C.; ROSS, S. H. Serum protein patterns in leprosy. I. Carville survey. *Int. J. Leprosy*, 28 (2) :144-154, 1960.
19. NEILL, M. H. & DEWAR, M. M. The plasma proteins in leprosy. *Publ. Health Bull.*, 168:1-20, 1927.
20. RUBINO, M. C. Nueva reacción serológica de la lepra. *Rev. Méd. Urug.*, 29:144-151, 1926.
21. RUBINO, M. C. Séro-diagnostic de la lepre par l'agglutino-sédimentation des globules de mouton formolés. *Ann. Inst. Pasteur*, 47:147-172, 1931.
22. SEIBERT, F. B. & NELSON, J. W. Electrophoresis of serum. Serum proteins in tuberculosis and other chronic diseases. *Amer. Rev. Tuberc.*, 47:66-77, 1943.
23. SERIE, C. & SCHALLER, K. F. L'électrophorèse et la lèpre. *Bull. Soc. Path. Exot.*, 50(1) :17-21, 1957.
24. SIEGEL, S. *Nonparametric statistics for the behavioral sciences*. New York, McGraw-Hill, 1956. p. 116, 184.
25. TARABINI-CASTELLANI, G. Considerations del origen de la disproteinemia hanseniana y sus efectos. *Rev. Leprol. Fontilles*, 4(4) :227-234, 1957.
26. UYGUANCO, M. L. G.; RODRIGUES, J. N.; CONCEPCION, I. Studies on the biochemistry of leprosy. *J. Pak. Med. Ass.*, 26:65-73, 1950.
27. VAZ, C. A. C.; FERRI, R. G.; GEISDHOVEL, N.; CAMPOS, A. N. P. Eletroforese sobre acetato de celulose (CAF). Reprodutibilidade e valores normais. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 31:71-75, 1971.

Recebido para publicação em 30 de agosto de 1975.