

## Conferências, Aulas e Cursos

### FUTURO DA IMUNOLOGIA <sup>(1)</sup>

Pierre GRABAR

Para terminar êste curso pediram-me uma aula especial. Seu título poderia fazer pensar numa profecia. Entretanto, como não possuo dom de profeta, tentarei simplesmente falar sôbre alguns aspectos gerais dos problemas imunológicos, bem como das possibilidades que nos oferecem os conhecimentos já adquiridos.

Dois aspectos serão considerados:

- I. A imunologia pròpriamente dita e
- II. A aplicação das reações imunológicas ao estudo de outros problemas.

I. *Imunologia pròpriamente dita* — Tendo seguido êste curso, puderam os senhores tomar conhecimento da enorme quantidade de trabalhos efetuados no domínio da Imunologia, do acúmulo considerável de dados experimentais. Mais ainda, viram que existem observações contraditórias. E, finalmente, puderam constatar que a maioria das teorias se baseia em hipóteses que freqüentemente não são e nem mesmo podem ser controladas por experiências indiscutíveis. É fácil notar que, em sua maioria, os fenômenos imunitários mais fundamentais não estão bem esclarecidos, existindo lacunas importantes em nossos conhecimentos.

Tomemos alguns exemplos.

1) É manifesta a imprecisão de definições importantes da imunidade chamada "específica", como as de antígeno e de anticorpo. Isto resulta do fato de ignorarmos porque uma substância pode ser antigênica. Admitimos que se trata de determinada estrutura química de uma molécula e da con-

figuração espacial de grupamentos químicos desta estrutura. Já conhecemos alguns destes grupamentos específicos nos antígenos naturais de natureza poliosídica, mas não ainda nas proteínas. Os estudos sôbre os polipeptídios sintéticos mostraram que a introdução de um grupo cíclico e/ou de grupamentos polares favorece a antigenicidade. Parece, entretanto, que êstes fatos não bastam e a questão sôbre as razões precisas da antigenicidade permanece ainda aberta.

2) A situação é menos nítida quando se considera o mecanismo da formação dos anticorpos. Tôda uma série de questões fica sem resposta precisa. Vejamos algumas:

a) Entre o momento da penetração do antígeno e o aparecimento dos anticorpos, existe um tempo de latência. O que sucede ao antígeno durante êsse tempo? O antígeno ou seus produtos de degradação são encontrados no interior das células. Mas não se sabe se sua presença em determinadas células tem qualquer significação. Poder-se-ia mesmo supor que não desempenham papel importante e que nada mais são do que depósitos fortuitos.

b) O mecanismo de síntese das moléculas de anticorpo é também desconhecido e está compreendido num problema geral de bioquímica — o da biossíntese das proteínas. Como os senhores sabem, no momento, o que conhecemos dessa questão está no terreno das hipóteses.

c) O mesmo se diga em relação aos mecanismos da reação secundária e da dose de reforço.

(1) Aula proferida no "Curso de Imunologia Geral e Sorologia" do Instituto Pasteur de Paris, a 24 de junho de 1961.

d) Não conhecemos também o que acontece com os complexos antígeno-anticorpo, gerados quando o antígeno penetra no organismo imunizado. Admite-se em geral que os complexos sejam fagocitados, mas o resto é ignorado. Supõe-se que haja degradação enzimática do antígeno, mas não se sabe se a união ao anticorpo favorece tal degradação.

3) Entre os fenômenos imunológicos importantes, destaca-se um de descoberta recente — o fenômeno da tolerância imunológica adquirida, que apresenta não somente considerável interesse teórico, mas que poderá ter aplicações práticas importantes. O mecanismo exato deste fenômeno não está ainda elucidado, mas está certamente ligado às duas questões precedentes: a antigenicidade e a intervenção dos antígenos no mecanismo de formação dos anticorpos. É provável, portanto, que esse fenômeno seja melhor compreendido quando se encontrarem as respostas àquelas questões.

4) É o que sucede também com outro problema muito importante, atualmente na ordem do dia — o da auto-antigenicidade. Não possuímos, no momento, senão explicações baseadas em hipóteses mais ou menos bem fundamentadas.

A questão só será bem elucidada quando se conhecerem os problemas correlatos da antigenicidade e do mecanismo de formação dos anticorpos.

\*  
\* \*

Tais exemplos mostram bem que problemas fundamentais permanecem ainda mal compreendidos. Ainda há muito assunto para os pesquisadores.

Contudo, não somos totalmente ignorantes e do conjunto de fatos já conhecidos é possível tirar um certo número de conclusões gerais. É, justamente, o que tentarei fazer, passando em revista algumas das noções que foram expostas neste curso.

Quando se fala em imunidade, classificam-se geralmente os mecanismos de defesa dos organismos superiores em dois grupos: 1) as defesas naturais não específicas e 2) os mecanismos imunitários específicos.

1 — No primeiro grupo encontra-se uma série de fatores muito díspares, indo das defesas naturais passivas, como as barreiras naturais (pele, mucosas, pH do suco gástrico ou do suor, etc.) até mecanismos bem definidos, como a fagocitose ou a ação lítica do complemento. Ora, como os senhores sabem, a fagocitose e a ação do complemento são particularmente facilitadas pelos anticorpos. Portanto, se bem que estas duas atividades não sejam de *per se* específicas, dela participam os fatores específicos.

Notemos, a esse respeito, que a questão dos anticorpos chamados “naturais” parece atualmente mais bem definida. Designavam-se sob a denominação de “anticorpos naturais” substâncias que tinham as propriedades específicas dos anticorpos, mas de origem não definida e encontradas nos soros ditos “normais”. As constatações feitas em animais criados estérilmente (“germ free animals”) confirmaram a hipótese de que os “anticorpos normais” são verdadeiros anticorpos, que aparecem em consequência a infecções inaparentes ou simplesmente após penetração da substância antigênica no meio interior de um animal ou do homem.

Vemos, assim, que, dentre os mecanismos classicamente colocados na categoria dos mecanismos de defesa “não específicos”, os anticorpos desempenham papel relevante.

Que dizer das outras defesas “não específicas”? Descreveram-se sob nomes diferentes, as atividades bactericidas ou anti-infecciosas de diversos humores. Infelizmente, os ensinamentos que possuímos hoje sobre seu modo de ação são geralmente mal definidos e freqüentemente controvertidos. Exemplo: o caso da properdina.

Pode-se, contudo, considerar as atividades bactericidas diretas. Assim, sabe-se que as lágrimas e o soro contêm lisozima, que possui forte atividade enzimática sobre substâncias capsulares microbianas.

É evidente que outras enzimas podem também intervir nos mecanismos anti-infecciosos. Seria, entretanto, um pouco demais finalista classificá-las como mecanismos de defesa natural.

2 — Quando se fala de “*fatores imunitários específicos*”, pensa-se, sobretudo, em anticorpos.

O fato de que a existência de anticorpos foi inicialmente verificada após uma infecção, introduziu a noção de que os anticorpos representavam um mecanismo específico de defesa. Essa idéia está profundamente arraigada na Imunologia. Contudo, refletindo-se um pouco, conclui-se que ela não é de nenhum modo correta. Com efeito, sabemos atualmente:

a) Que toda substância antigênica pode provocar a formação de anticorpos;

b) que, dentre os anticorpos produzidos por um animal contra os constituintes microbianos, por exemplo, somente alguns participam da defesa do organismo contra a infecção, enquanto que outros são apenas testemunhos da passagem do antígeno pelo organismo;

c) que o organismo pode formar anticorpos contra quaisquer proteínas, mesmo introduzidas por via oral, como, por exemplo, nas experiências de FARR. Este autor deu a coelhos, por via oral, soluções de sôro-albumina bovina (SAB) e constatou o aparecimento no sôro de uma pequena quantidade de anticorpos anti-SAB;

d) há vários anos verifiquei que o sôro de animais chamados "normais" pode dar reações imunológicas (hemaglutinação passiva) com diversos produtos macromoleculares naturais, tais como glicogênio, amido, gelatina, dextran e, no caso de soros de cães, com a sôro-albumina bovina;

e) por outro lado, conhecem-se numerosos casos onde os anticorpos podem provocar conseqüências nefastas: alergia, lesões provocadas pela auto-imunização.

O conjunto destes fatos fala a favor da hipótese que eu já lhes mencionei em minha aula sobre anticorpos, que considera a anticorpo-gênese não como um mecanismo especial de defesa, mas como um mecanismo fisiológico geral de síntese das globulinas, cujo papel é o de servir de "transportadores". Nas condições habituais, estas globulinas transportariam produtos de metabolismo ou do catabolismo, mas se uma substância antigênica estranha penetra no meio interno, o mesmo mecanismo sintetizará globulinas que se unirão especificamente ao antígeno. Entre estas globulinas haverá al-

gumas que, ao se combinarem com certos antígenos (por exemplo, micróbios ou vírus), favorecerão a defesa do organismo contra este agente patogênico ou suas toxinas, etc. Ao contrário, outras globulinas não terão qualquer efeito protetor e, às vezes mesmo, acarretarão conseqüências desagradáveis.

Essa maneira de encarar o problema da formação dos anticorpos apresenta, a meu ver, um certo número de vantagens. Além disso, salienta o fato de que a formação dos anticorpos é um fenômeno muito geral.

Um segundo fato muito geral é a reação antígeno-anticorpo, incluída mesmo na definição clássica dos anticorpos. Se a formação de anticorpos pode ser considerada como um fenômeno biológico, pois se trata da biossíntese de uma proteína, a união do antígeno com seu anticorpo é um fenômeno puramente físico-químico.

Sabemos atualmente que as reações entre o antígeno e anticorpo podem-se manifestar de diferentes maneiras: algumas vezes chegam à precipitação, outras não; algumas vezes, fixam o complemento, outras, pouco ou nada, etc. Essas diversas observações encontram fácil explicação no fato de que os anticorpos não são todos idênticos.

a) Sabemos que existe uma heterogeneidade em suas especificidades: mesmo contra um antígeno puro e homogêneo, há formação de vários anticorpos diferentes, que reagem com partes diferentes da molécula;

b) Os anticorpos são também heterogêneos do ponto de vista físico-químico: peso molecular, mobilidade eletroforética. Tal heterogeneidade pode explicar as diferentes manifestações da união antígeno-anticorpo, por exemplo sua insolubilização, quando numerosos grupamentos que mantêm em solução as macromoléculas reagentes estão bloqueados em conseqüência de sua união.

Mas a reação antígeno-anticorpo não se limita sempre a essas conseqüências simples. Com efeito, quase todos os fenômenos imunológicos específicos conhecidos são conseqüência desta reação.

Parece que a primeira poderia ser o aparecimento de grupamentos-SH livres. Há dois anos, em colaboração com PRUDHOMME e MME. ROBERT, verificamos que a reação

*in vitro* entre um antígeno protéico ou um hapteno poliosídico e seus anticorpos libera grupamentos-SH. Este fato tem sido confirmado e pudemos mesmo apreciá-lo quantitativamente por amperometria.

Como acabo de dizer, acredito que esta liberação de grupamentos-SH possa ser a primeira das conseqüências da união antígeno-anticorpo, desencadeando, em seguida, outros fenômenos. Com efeito, sabemos que os grupamentos-SH são muito reativos e que participam freqüentemente da atividade enzimática. O aparecimento de grupamentos dêsse tipo poderia ser a causa da ativação de um pro-enzima.

Assim, existe na literatura indicação de que na reação de fixação do complemento os grupamentos-SH são necessários. Por outro lado, sabe-se também que a liberação de histamina e de substâncias análogas, que é a base das manifestações anafiláticas, é inibida por substâncias que bloqueiam os grupamentos-SH. Em experiências recentes constatamos que, quando se prepara anafilatoxina pelo tratamento de sôro de rato com poliosídios, há também liberação de grupamentos-SH. No momento seria imprudente tirar a conclusão de que nossa observação constitui o fundamento da fixação de complemento e da liberação de histamina, mas o paralelismo parece promissor.

De qualquer modo, pode-se admitir que a união antígeno-anticorpo pode provocar fenômenos como o choque anafilático ou a lise de células (hemólise ou lise de células bacterianas, ou lise de células por efeito citotóxico dos anticorpos), e que êstes fenômenos estão intimamente ligados às ações enzimáticas.

É necessário frisar que para a lise das células é necessária a participação do complemento, e que até o presente não se observou lise senão quando o antígeno em jôgo está situado na superfície de uma célula.

O problema da situação do antígeno numa célula tratada por um imune-sôro foi recentemente discutido e verificou-se que não se conhece bem o que acontece a uma célula colocada em presença de anticorpos específicos contra os constituintes intracelulares. O único exemplo seria a ação sôbre o núcleo dos leucócitos dos soros de casos de lupus eritematoso, que contém anticorpos anti-DNA.

Ora, êsse problema é certamente muito importante: por exemplo, na neutralização dos vírus intracelulares, na ação antiparasitária e, provávelmente, nos problemas imunológicos do câncer. Poder-se-ia perguntar se o fenômeno de *facilitação* não é devido a uma ação de anticorpos anticonstituintes intracelulares. O fenômeno da *facilitação* ("enhancement") foi descrito há vários anos: trata-se de uma proliferação acelerada de um tumor transplantado num animal que foi antes imunizado por macerados do mesmo tumor liofilizado. Estas experiências lembram as observações antigas de METCHNIKOFF, BESREDKA & CANTACUZÈNE, que trataram animais e homens por pequeníssimas quantidades de imune-sôro antileucócitos. Tal tratamento provoca hiperleucocitose acentuada. Poder-se-ia perguntar se êstes soros imunes que eram citotóxicos (provocavam a lise dos leucócitos), quando utilizados em doses fracas teriam atividade diferente daquela observada com doses fortes.

Várias explicações diferentes podem ser dadas ao fenômeno de *facilitação*, mas é certo que se trata de uma ação de anticorpos que se encontram no sôro, das quais é preciso pouco para provocar uma proliferação celular. Penso que êste fenômeno pode desempenhar papel importante em cancerologia.

De tudo que ficou dito sôbre os mecanismos específicos da imunidade, pode-se tirar a conclusão de que existem dois fenômenos gerais: a formação de anticorpos e a reação antígeno-anticorpo. Esta última pode acarretar conseqüências variadas que dependem de outros fatores e nos quais intervêm mecanismos diferentes, entre os quais, atividades enzimáticas.

\*  
\* \*

Como os senhores sabem, a penetração de alguns antígenos num organismo determina reações de tipo retardado, chamadas freqüentemente de "tipo tuberculínico". Estas reações não podem ser transmitidas passivamente pelo sôro, mas sômente pela transferência de elementos celulares; não se trataria, portanto, dos anticorpos comuns do sôro.

O mecanismo preciso destas reações não foi ainda elucidado, mas sabe-se que reações dêste gênero têm grande importância não

sòmente nos casos de alergia tuberculínica ou devida a outros microorganismos, mas também na rejeição dos transplantes e, provavelmente, nos casos de auto-imunização. Alguns acreditam que se trata, nestes casos, também da formação de anticorpos, mas em nível tão baixo, que não se pode detectá-los no soro. Entretanto, a maior parte dos imunologistas admite que, neste caso, o mecanismo deva ser diferente.

II — *Utilização dos métodos imunológicos*  
— Como foi dito no início desta lição, ao lado de problemas imunológicos pròpriamente ditos, a imunologia moderna pode também ajudar a resolver problemas diferentes. Com efeito, o imunologista pode preparar à vontade reativos altamente específicos, os anticorpos. O emprêgo consciencioso destes reativos permite numerosas pesquisas. Podemos agrupar as principais possibilidades de aplicação dos métodos imunológicos em três categorias:

- 1) Demonstração da presença de uma substância.
- 2) Observação de modificações de uma substância.
- 3) Determinação da estrutura de uma substância.

1) A especificidade e a sensibilidade das reações antígeno-anticorpo permitem a demonstração de quantidades mínimas de uma substância. Em princípio, sòmente as substâncias antigênicas ou os haptenos podem ser demonstrados, mas poder-se-iam considerar também substâncias de molécula pequena. Com efeito, fixando-as sôbre proteínas, poderíamos obter antígenos artificiais que provocariam a formação de anticorpos específicos contra essas pequenas moléculas.

Em minha aula sôbre análise imuno-eletrorética, citamos um certo número de exemplos de resultados obtidos graças a êste método. Êle permite, com efeito, não sòmente separar os constituintes de uma mistura, demonstrar a existência destes constituintes, mas também defini-los por suas mobilidades eletroréticas e, às vêzes, por meio de colorações específicas.

Outros métodos podem também prestar bons serviços. O método de precipitação

em tubos contendo meio gelificado, segundo OUDIN (difusão simples), pode ser utilizado até certo ponto para apreciações quantitativas. O método de OUCHTERLONY (dupla difusão) em placas é muito útil para a comparação de diferentes substâncias antigênicas, a fim de estabelecer sua identidade ou diferenças.

Enfim, o método quantitativo de precipitação específica de HEIDELBERGER & KENDALL permite dosar os antígenos.

Outros métodos imunológicos são menos utilizados em pesquisas dêste gênero. Mas a grande sensibilidade de certos métodos, tais como a anafilaxia cutânea passiva (OVARY) ou a hemaglutinação passiva (BOYDEN), permite fazer constatações interessantes, do mesmo modo que o emprêgo do choque anafilático direto. O emprêgo de anticorpos marcados por corantes fluorescentes ou por elementos radioativos permite, às vêzes, precisar a origem ou a posição intracelular de uma substância.

Em suma, pode-se, escolhendo judiciosamente o material e o método:

- a) Demonstrar a presença de uma substância em misturas complexas e sua dosagem.
- b) Demonstrar a presença de uma impureza.
- c) Separar e definir os constituintes de uma mistura.
- d) Comparar substâncias de origens diferentes e estabelecer o parentesco entre elas.
- e) Demonstrar a origem ou o local de formação de uma substância antigênica, etc.

2) Quando se procura demonstrar a modificação de uma substância, pode-se também fazer uso de métodos imunológicos. Com efeito, se a modificação em causa atinge parte da molécula portadora de um gruppamento determinante, sua reação com o anticorpo será modificada. Por outro lado, se a modificação se dá numa parte da molécula que intervém em suas propriedades físico-químicas, pode-se, por exemplo, constatar uma mobilidade eletrorética diferen-

te. Nestes casos, a análise imuno-eletróforética já prestou bons serviços. A análise quantitativa, as curvas de precipitação específica fornecem também ensinamentos preciosos.

3) E, para terminar, gostaria de assinalar o interesse das reações imunológicas nos estudos sobre a estrutura de macromoléculas naturais.

Até o presente foram os estudos sobre os polisídeos que forneceram os resultados mais notáveis. Como os senhores certamente sabem, foi utilizando reações de inibição quantitativa da precipitação específica, que se chegou a precisar a estrutura fina das ligações entre os açúcares simples nos polio-

sídeos. A análise química destas estruturas foi, deste modo, enormemente facilitada.

No entanto, pesquisas análogas sobre a estrutura fina das proteínas, de lípidos polimerizados e dos ácidos nucléicos encontram dificuldades. Não é impossível que essas dificuldades residam no fato de existirem, por exemplo, nas moléculas protéicas (e nos ácidos nucléicos), estruturas em hélice. Os grupamentos externos não correspondem à seqüência real dos ácidos aminados na cadeia peptídica. Entretanto, pode-se esperar que os estudos sobre polipeptídeos sintéticos, de um lado, e sobre produtos de degradação de proteínas naturais de outro, forneçam em breve ensinamentos preciosos sobre a estrutura das proteínas.