

ÇÃO DA PENICILINA NA RESPOSTA IMUNITÁRIA À ESTREPTOLISINA O

Adhemar M. FIORILLO (1), João Carlos da COSTA (2)
e Euclydes Custódio de LIMA Filho (3)

RESUMO

Foi feito estudo experimental em coelhos, a fim de verificar a influência da penicilina na resposta imunitária à Estreptolisina O. A penicilina foi injetada simultaneamente com o antígeno ou, então, desde o período de uma semana anteriormente a qualquer injeção do mesmo. A análise estatística dos resultados mostrou diferença de comportamento dos coelhos contrôles, que não foram submetidos à injeções do antibiótico, em relação àqueles que tomaram a droga. Por outro lado, a diferença foi mais nítida com o grupo que tomou a penicilina por período de uma semana anteriormente à primeira dose imunizante.

Os Autores concluem que esse antibiótico pode influir no mecanismo de resposta, independentemente da eliminação dos estreptococos da garganta dos pacientes, como indicam os estudos clínicos, interferindo, pois, ao nível da síntese dos anticorpos.

INTRODUÇÃO

Sabe-se, há anos, que a resposta imunitária à infecção estreptocócica, avaliada através da produção de anticorpos a antígenos desses germes, como a anti-estreptolisina O, se comporta diferentemente se os pacientes forem ou não submetidos à terapêutica pela penicilina^{1, 5, 6, 7, 10}. Dados de observação clínica minuciosa mostram que esse antibiótico interfere com os títulos desse anticorpo do soro dos pacientes, quer quanto à frequência, quer quanto ao grau de resposta. Estudos feitos paralelamente à verificação do tempo de persistência dos estreptococos patogênicos na garganta de tais pacientes, trouxeram conclusões indiretas de que a droga pode agir através da eliminação das bactérias, isto é, da remoção do estímulo antigênico⁵. Por outro lado, avolumam-se os trabalhos de ordem experimental, mos-

trando ação provável ou indubitável de antibióticos na síntese de proteínas, *sensu lato*⁴, e na dos anticorpos, *sensu stricto*, através de mecanismos bioquímicos ao nível das células imunologicamente competentes⁹.

A observação de pacientes não permite dissociar o que estaria na dependência do estímulo antigênico daquilo que é conseqüente a bloqueio bioquímico. Injetando-se em coelhos um dos antígenos dos estreptococos, no caso presente a Estreptolisina O, em vez de culturas desses germes, e estudando-se os níveis séricos de anti-Estreptolisina O resultantes, quando os citados animais são submetidos à ação simultânea da penicilina, poderíamos saber até onde o antibiótico usado, em doses equivalentes às empregadas em terapêutica humana, interfere com o mecanismo de síntese desse anticorpo.

Este trabalho foi, em parte, auxiliado pelo Fundo de Pesquisas Médicas de Ribeirão Preto. Departamento de Clínica Médica (Prof. Hélio Lourenço de Oliveira) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil

- (1) Professor de Disciplina — Moléstias Infecciosas e Tropicais — Departamento de Clínica Médica
- (2) Instrutor — Departamento de Clínica Médica
- (3) Instrutor — Departamento de Matemática (Prof. Geraldo G. Duarte)

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados 71 coelhos, machos, brancos e pardos, com peso superior a dois quilogramas. Executamos três experimentos diferentes, que serão descritos a seguir.

Experimento I — Foram utilizados 11 coelhos. Numa primeira fase imunizamos os animais com três doses de Estreptolisina O, intervaladas de 4 dias, entre uma e outra injeção, no primeiro mês do experimento. Numa segunda fase, no decorrer do segundo mês de imunização, demos um “booster”, em duas doses, intervaladas de 7 dias. Nesta fase os coelhos foram repartidos em dois grupos, um com 7 e outro com 4 coelhos. Os do primeiro grupo, simultaneamente às doses imunizantes (fase de “booster”) foram submetidos à terapêutica pela penicilina; os do segundo grupo não tomaram esse antibiótico (Gráfico I).

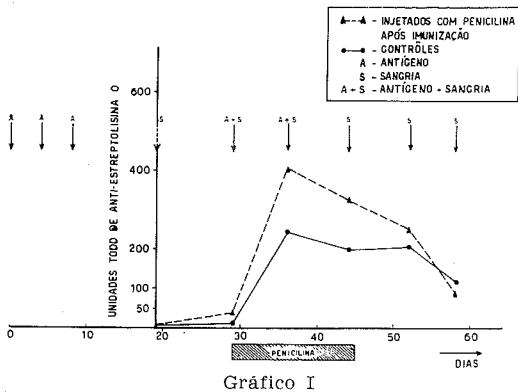


Gráfico I

Experimento II — Neste, utilizamos 60 coelhos. O experimento total não foi executado em uma mesma época. Os animais foram repartidos em três grupos: Grupo I, com 18 coelhos; Grupo II, com 16 coelhos e o Grupo III, com 26 coelhos. A técnica de imunização foi idêntica à do experimento I. Os Grupos I e II foram submetidos à ação da penicilina, enquanto que o Grupo III não tomou antibiótico. Esta droga foi usada durante 28 dias e as injeções foram iniciadas 7 dias antes da imunização no Grupo I, e simultaneamente à mesma, no Grupo II (Gráfico II).

Experimento III — Neste, os coelhos utilizados foram alguns do experimento anterior, após período de repouso de 67 dias.

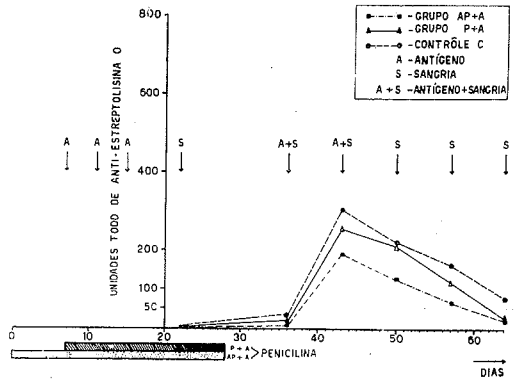


Gráfico II

Os escolhidos foram os de peso mais elevado, portanto em condições melhores para a imunização. Estes animais foram repartidos em dois Grupos: Grupo I, com 10 coelhos e Grupo II, com 9 coelhos, sendo que no primeiro grupo a penicilina foi administrada desde 7 dias antes da reimunização, enquanto que no segundo grupo o antibiótico foi injetado simultaneamente à reimunização (Gráfico III).

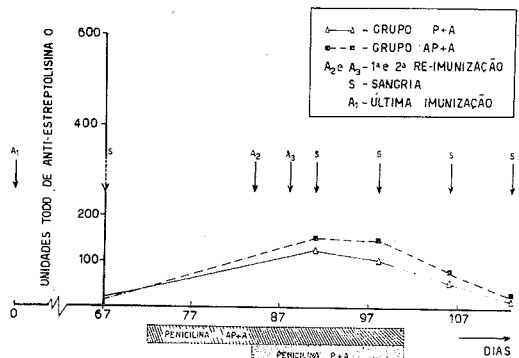


Gráfico III

*Estreptolisina O** — A Estreptolisina O foi dissolvida em soro fisiológico e injetada no tecido celular subcutâneo, na dose de 14 “combining unit” (HODGE-SWIFT³), em cada coelho, por vez.

Penicilina — Fizemos uma injeção intramuscular por dia, em cada coelho, na dose de 100.000 unidades de penicilina procaína. Escolhemos esta dose levando em conta a experiência prévia em animais⁹ e em investigação clínica⁵ com a finalidade de estudo da supressão da resposta imunológica.

* Gentilmente cedida pelo Instituto Sieroterapico Milanese, Itália

Dosagem de anti-estreptolisina O — Executada de acôrdo com o método de RANTZ & RANDALL, modificado para microtécnica².

Os coelhos foram sangrados na veia marginal da orelha. Os soros, assim que separados, foram conservados em "freezer" a -10°C , até o momento das dosagens.

RESULTADOS

1) *Resposta imunitária dos coelhos contrôles* — Os coelhos do Grupo (C), imunizados conforme técnica descrita, apresentaram títulos de anti-estreptolisina O em unidades Todd como registrados no Quadro IV. A elevação nítida de títulos tornou-se evidente apenas na fase de "booster" (Gráfico I).

2) *Experimento I* — Os títulos de anti-estreptolisina O, obtidos neste experimento, estão registrados no Quadro V e Gráfico I.

3) *Experimento II* — Os resultados deste experimento estão registrados nos Quadros VI e VII e no Gráfico II. O Quadro VI é de animais que receberam penicilina simultaneamente à imunização (P + A) e o Quadro VII de coelhos submetidos ao antibiótico desde período de uma semana anteriormente à imunização (AP + A).

4) *Experimento III* — Os resultados deste experimento estão registrados no Quadro VIII e Gráfico III — um grupo em que a administração da penicilina precedeu uma semana à reimunização e outro em que o antibiótico foi injetado no período da reimunização.

Análise do experimento I — Os dados para a análise do experimento I foram retirados do Quadro V, correspondentes aos 36 dias da 1.^a dose imunizante. A análise de variância dos referidos dados fornece o Quadro I.

QUADRO I

Critério	G. 1	S.Q.	Q.M.	F
Entre	1	0,248	0,248	
Dentro	20	2,174	0,108	2,29
Total	21	2,422		

O F observado não é significativo ao nível de 5%

Experimento II — Os resultados deste experimento estão registrados nos Quadros VI e VII e no Gráfico II. O Quadro VI é de dados dos animais que receberam penicilina simultaneamente à imunização (P + A) e o Quadro VII de coelhos que receberam antibiótico desde um período de uma semana anteriormente à imunização (AP + A). Os dados para a análise estatística foram retirados dos Quadros IV (C), VI (P + A) e VII (AP + A), correspondentes aos 36 dias da 1.^a dose imunizante. A análise de variância dos referidos dados fornece o Quadro II.

QUADRO II

Critério	G. 1	S.Q.	Q.M.	F
Entre	2	2,403	1,2011	
Dentro	57	20,930	0,3673	3,27
Total	59	23,333		

O F observado é significativo ao nível de 5%

Experimento III — Os resultados deste experimento estão registrados no Quadro VIII e Gráfico III. Os dados para a análise estatística foram retirados desse Quadro, correspondentes aos 98 dias da última imunização. A análise de variância fornece o Quadro III.

QUADRO III

Critério	G. 1	S.Q.	Q.M.	F
Entre	1	0,20430	0,20430	
Dentro	17	5,01929	0,29525	0,692
Total	18	5,22359		

O F observado não é significativo ao nível de 5%

Aplicando-se o teste de Scheffè, a fim de comparar:

- 1) Grupo contrôles com P + A
- 2) Grupo contrôles com AP + A
- 3) P + A com AP + A
- 4) Grupo contrôles com as médias dos grupos P + A, AP + A, os valores

obtidos para as diferentes comparações foram:

- 1.^a comparação — 1,88
- 2.^a comparação — 2,31
- 3.^a comparação — 0,28
- 4.^a comparação — 2,53

O valor crítico do teste de Scheffè para $S = 5\%$ é igual a 2,50, sendo portanto significativa a 4.^a comparação.

QUADRO IV

Titulos de anti-estreptolisina O em unidades Todd, de coelhos contrôles (C), em dias correspondentes à primeira injeção de antígeno

Coelhos N.º	Dias a partir da 1. ^a dose imunizante					
	15	29	36	43	52	58
1	0	12	500	250	166	50
2	0	12	125	—	—	—*
3	0	12	500	333	333	100
4	0	12	100	166	166	50
5	12	12	333	625	—	833
6	12	12	12	166	166	125
7	0	12	50	50	50	12
8	12	12	166	250	333	100
9	0	12	166	166	333	50
10	12	12	50	50	100	50
11	0	12	333	250	100	50
12	0	12	50	100	333	50
13	12	50	333	333	333	166
14	0	0	125	125	125	12
15	12	100	333	166	50	12
16	0	12	333	250	166	50
17	50	166	333	333	166	50
18	12	50	125	100	12	0
19	0	12	500	500	333	100
20	0	12	833	333	125	12
21	0	0	500	166	125	12
22	0	0	333	125	100	12
23	0	0	500	166	125	0
24	0	12	333	166	125	0
25	0	12	625	250	100	0
26	0	12	333	166	50	0

* Este animal veio a morrer

DISCUSSÃO

Considerando-se as diversas possibilidades de ação da penicilina na resposta imunitária à Estreptolisina O, fizemos três tipos diferentes de experimento: num primeiro, pro-

QUADRO V

Titulos de anti-estreptolisina O em unidades Todd, de coelhos contrôles e de coelhos submetidos à penicilina, simultaneamente às doses imunizantes, em fase de "booster"

Coelhos N.º	Dias a partir da 1. ^a dose imunizante					
	19	29	36	43	50	57
Com antibiótico						
1	0	12	166	125	50	166
2	12	50	625	625	625	166
4	0	166	333	125	125	12
6	12	12	125	50	50	12
8	0	0	625	625	625	—
9	12	12	166	125	166	12
10	12	12	833	625	125	166
Contrôles						
11	0	12	166	166	333	50
12	12	12	50	50	100	50
15	0	12	333	250	625	250
19	0	12	50	100	333	50
20	0	12	500	250	166	50
21	0	12	125	—	—	—
22	0	12	100	166	166	50
23	12	12	333	625	—	833
24	12	50	333	333	333	166
25	0	0	125	125	125	12
26	12	100	333	166	50	12
27	12	50	125	100	12	0
28	0	0	500	166	125	0
29	0	0	333	125	100	12

QUADRO VI

Titulos de anti-estreptolisina O em unidades Todd, de coelhos que tomaram penicilina simultaneamente à imunização (P + A)

Coelhos N.º	Dias a partir da 1. ^a dose imunizante					
	15	29	36	43	50	57
1	0	0	125	125	12	12
2	50	100	133	250	250	125
3	12	12	166	125	166	125
4	0	0	12	50	12	0
5	0	0	12	125	125	50
6	0	0	12	12	12	0
7	0	0	12	50	12	0
8	0	0	12	50	12	0
9	0	0	12	12	12	0
10	0	12	500	333	250	50
11	0	0	333	333	250	12
12	12	125	833	625	250	12
13	0	0	125	125	50	0
14	0	0	166	50	12	0
15	0	12	625	625	166	12
16	0	12	833	500	333	50

curaríamos avaliar a ação desse antibiótico nas células imunologicamente competentes, quando usado simultaneamente ao antígeno; num segundo, o antibiótico poderia agir nas mesmas em fase anterior a qualquer contato com o antígeno; num terceiro, em células de animais já anteriormente imunizados e em período de reimunização, após repouso prolongado, em ação simultânea com o antígeno.

QUADRO VII

Títulos de anti-estreptolisina O em unidades Todd, de coelhos que receberam penicilina por período de uma semana, anteriormente à imunização (AP + A)

Coelhos N.º	Dias a partir da 1.ª dose imunizante					
	15	29	36	43	50	57
1	12	50	50	100	125	50
2	0	12	50	12	12	12
3	0	12	250	333	125	12
4	0	0	12	0	0	0
5	0	0	12	50	0	0
6	0	0	12	0	0	0
7	0	0	12	0	0	0
8	0	0	12	0	0	0
9	0	0	12	12	12	0
10	0	0	166	125	50	0
11	0	12	625	333	250	100
12	0	12	250	166	12	0
13	0	0	625	333	250	100
14	0	0	250	166	125	12
15	0	0	250	125	50	12
16	0	12	125	100	50	12
17	0	0	166	125	50	0
18	0	0	625	250	166	50

A análise dos resultados do experimento I, com F não significativa ao nível de 5%, nos autoriza a concluir que o antibiótico não influiu na resposta imunitária, quando usado no período de imunização. A análise dos resultados do experimento II, com F significativa ao nível de 5%, completada com o teste de Scheffé, nos indica diferença de comportamento dos animais que tomaram o antibiótico, em relação aos controles, em especial na fase que precedeu à imunização. Existe, pois, a possibilidade de a penicilina agir na síntese de anti-estreptolisina O. A análise dos resultados do experimento III, com F não significativa ao nível de 5%, mostra a não interferência do antibiótico, na reação imunitária, na fase de reimunização.

QUADRO VIII

Títulos de anti-estreptolisina O em unidades Todd, de coelhos que foram reimunizados após 67 dias da última injeção de antígeno. Os animais de 1 a 8 tomaram penicilina durante uma semana anteriormente à reimunização, e os de 21 a 30 foram submetidos ao antibiótico simultaneamente à reimunização

Coelhos N.º	Dias a partir da última imunização				
	67	91	98	106	113
1	50	166	333	125	12
3	12	12	12	12	0
4	12	12	125	50	12
5	12	100	166	100	50
6	0	12	12	12	0
7	0	250	100	50	12
8	12	333	333	166	100
21	50	333	125	125	50
22	12	12	50	12	0
23	12	333	250	166	100
11	0	125	12	12	0
12	125	333	125	100	12
14	50	50	12	12	0
18	12	12	12	12	12
20	12	50	125	50	12
24	12	166	166	125	50
25	0	125	50	12	0
29	0	166	100	50	12
30	12	100	133	125	50

WEINSTEIN & TSAO¹⁰, ANDERSON & col.¹, KILBOURNE & LOGE⁵, MILLER & col.⁶, além de outros, estudando o efeito da penicilina sobre os títulos de anti-estreptolisina O, em pacientes com infecções estreptocócicas, concluíram que essa droga interfere na resposta imunitária, no sentido de seu bloqueio. KILBOURNE & LOGE⁵ verificaram, além disso, que o grau de interferência é proporcional, num certo período de tempo, à duração da ação do antibiótico e ao tempo de persistência das bactérias na garganta dos pacientes. Por outro lado, estudos sobre a influência de antibióticos na resposta imune, em infecções naturais ou em imunizações experimentais, têm fornecido dados que nos autorizam a pensar na possibilidade da penicilina agir bloqueando os mecanismos de reação aos antígenos estreptocócicos^{5, 7}.

Nossos resultados de ordem experimental, utilizando antígeno que não é constituído pelos germes vivos em atitude patogênica, vêm complementar os dados da observação clínica. Verificamos que a penicilina, quando usada em doses equivalentes às utilizadas

em terapêutica, pode influir na resposta imunitária às infecções estreptocócicas não somente através da eliminação das bactérias, isto é, do estímulo antigênico, como mostraram os Autores citados, mas também através da própria síntese dos respectivos anticorpos. Além disso, nossos resultados sugerem que a penicilina influi mais nitidamente se administrada anteriormente às injeções do antígeno. Esta observação, evidentemente, não tem equivalente na investigação clínica, nem podemos saber o quanto é importante nos fenômenos imunitários das estreptococias do homem.

SUMMARY

Action of Penicillin in the immunitary response to Streptolysin O

The Authors present an experimental work in rabbits to study the influence of Penicillin in their immunitary response to Streptolysin O. Penicillin was injected with the antigen in one group of animals and was started a week before in another group. The statistical analyses showed that the control rabbits which have not been injected with Penicillin presented a different immunitary response when compared to the injected group. This different response was much more evidente in the group injected with Penicillin a week before the first dose of Streptolysin O.

The Authors concluded that the antibiotic has influence on the response mechanism, not only through its action on the patient's throat streptococcus, as indicated by clinical studies, but also because it has influence on the antibody synthesis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDERSON, H. C.; KUNKEL, H. G. & McCARTY, M. — Quantitative antistreptokinase studies in patients infected with group A hemolytic streptococci; a comparison

with serum antistreptolysin and gamma globulin levels with special reference to the occurrence of rheumatic fever. *J. Clin. Invest.* 27:425-434, 1948.

2. CRAWFORD, Y. E. & ROBINSON, J. J. — Method for determining antistreptolysin O titer using capillary blood. *Amer. J. Clin. Path.* 24:1103-1109, 1954.
3. HODGE, B. E. & SWIFT, H. F. — Varying hemolytic and constant combining capacity of streptolysins. *J. Exp. Med.* 58:227-287, 1933.
4. HOTCHKISS, R. D. — The abnormal course of bacterial protein synthesis in the presence of Penicillin. *J. Exp. Med.* 91:351-364, 1950.
5. KILBOURNE, E. D. & LOGE, J. P. — The comparative effects of continuous and intermittent Penicillin therapy on the formation of antistreptolysin in hemolytic streptococcal pharyngitis. *J. Clin. Invest.* 27:418-424, 1948.
6. MILLER, J. M.; STANCER, S. L. & MASSELL, B. F. — A controlled study of beta hemolytic streptococcal infection in rheumatic families. *Amer. J. Med.* 25:825-856, 1958.
7. QUINN, R. W.; SEASTONE, C. V. & WEBER, R. W. — The relationship of the antigenic characteristics of streptococci and specific antibody responses following streptococcal infections. *J. Infect. Dis.* 93:57-64, 1953.
8. RICHOU, R. — Influence des antibiotiques sur l'immunité humorale consécutive à l'infection (naturelle ou expérimentale), à la Vaccinothérapie, à la Serothérapie et à l'Anatoxithérapie. *Rev. Path. Gen.* 712: 1187-1205, 1959.
9. STEVENS, K. M. — The effect of antibiotics upon the immune response. *J. Immun.* 71:119-124, 1953.
10. WEINSTEIN, L. & TSAO, C. L. — Effect of types of treatment on development of antistreptolysin in patients with scarlet fever. *Proc. Soc. Endocr. Biol. & Med.* 63:449-450, 1946.

Recebido para publicação em 29/3/1966.