

Estudos sôbre o complemento

1 — Ação das radiações de Rcentgen e ultravioleta

pelo

Dr. F. Rocha Lagôa

As opiniões a respeito da ação dos raios X sôbre o complemento existente nos sôros recentes, são contraditórias. Alguns autores (7), (11), afirmam determinarem essas radiações inativações do mesmo, enquanto, para outros, nada ocorreria. (2).

Em relação à ação das radiações ultravioletas sôbre o complemento, tem sido assinalado, por vários (1), (3), (4), (6), determinaram os mesmos a sua inativação, divergindo no entanto as opiniões em relação às condições em que esta inativação se processaria e, no tocante à sensibilidade dos vários componentes do complemento a essas radiações (9), (8), (13).

Visando esclarecer os motivos desta diversidade de opiniões, procedemos a série de verificações abaixo transcritas:

MATERIAL E MÉTODOS

Como complemento empregamos sôro recente dos seguintes animais: cobaio, cão, homem, coelho, cavalo e boi, utilizando-o sob 3 formas: em natureza; sêco no vácuo; ou diluído a 1:10 em água fisiológica esteril, conforme indicação nos quadros. A atividade complementar dos sôros usados foi aferida em relação à atividade hemolítica demonstrada quando em presença de hemácias de carneiro, prèviamente sensibilizadas com imune sôro específico. O sistema hemolítico utilizado foi constituído por hemácias de carneiro lavadas e diluídas na concentração de 2,5% em água fisiológica, as quais eram sensibilizadas 1 hora antes de serem utilizadas por um sôro hemolítico diluído de forma a conter 10 unidades hemolíticas por cada 1 ml da suspensão de hemácias.

As leituras da existência ou não de hemólise foram procedidas após incubação da mistura, durante 1 hora, em banho-maria a 37° C.

Como complemento sêco, denominamos o sôro recente com atividade complementar controlada, sêco no vácuo a baixa temperatura e assim conservado até o momento do uso, quando era feito o seu volume original; como complemento puro, denominamos sôro recente "in

natura”, sem diluições e como complemento diluído, chamamos sôro recente diluído a 1:10 em água fisiológica esteril.

Todo material irradiado foi sempre contido em pequenas placas de Petri de forma a oferecer 3 cms de superfície e 1 milímetro de espessura, sendo de quando em vez agitado. A temperatura durante a irradiação foi assegurada constante a $+ 10^{\circ}\text{C}$, por refrigeração permanente da placa onde êle se achava contido.

Os diversos componentes do complemento estudados, foram obtidos, os termo-lábeis, pelo processo de LIEFMANN, (corrente de Co^{2+} em água destilada gelada, após centrifugação, lavagem e suspensão em solução fisiológica da parte precipitada — fração globulina (C_1) — a fração albumina (C_2), não precipitada, teve sua isotônia restabelecida após eliminação do Co^{2+} e assim utilizada). As frações termo-estáveis, foram obtidas após um aquecimento em banho-maria a 56° durante meia hora que destruiu as frações termo-lábeis. Em seguida, destruiu-se o 3.º componente (C_3) quando se desejava obter puro o 4.º componente (C_4) e, destruindo-se o 4.º componente (C_4) quando se desejava obter puro o 3.º componente (C_3).

O método de destruição do 3.º componente (C_3) foi o do levedo (5) e do 4.º componente (C_4) pela ação da amônia (10).

O aparelho produtor de raios X empregado, foi um “Contactoterapia Phillips”, gentilmente cedido, mediante empréstimo, pela Casa Lohner do Rio de Janeiro, a qual deixamos aqui os nossos agradecimentos.

Êsse aparelho, produz radiações com comprimento de onda de $0,247 \text{ \AA}$, e na distância de 2 cms do material irradiado, que foi a empregada, sem filtros, forneceu um rendimento de 1.875 r., por minuto.

A fonte de radiação ultravioleta utilizada, foi uma lâmpada “Hanovia”, emitindo radiações de 2.482 \AA a 3.130 \AA , com um máximo de intensidade em 2.537 \AA , foi ela mantida sempre a 10 cms de distância do material irradiado que, como já foi dito, teve a constância da temperatura durante a irradiação assegurada.

RESULTADOS

Foi verificado que o complemento dos vários sôros utilizados revelaram idêntica sensibilidade tanto em relação às radiações ultravioletas como as de Roentgen.

O tempo necessário para a inativação pelas radiações ultravioletas é que variou, conforme o estado em que o complemento irradiado se achava; sêco, diluído a 1:10 ou sem diluição no sôro “in natura”, conforme mostra o quadro I.

Todos os complementos submetidos aos raios X, sob temperatura constante de $+ 10^{\circ}\text{C}$, não revelaram alterações em sua atividade hemo-

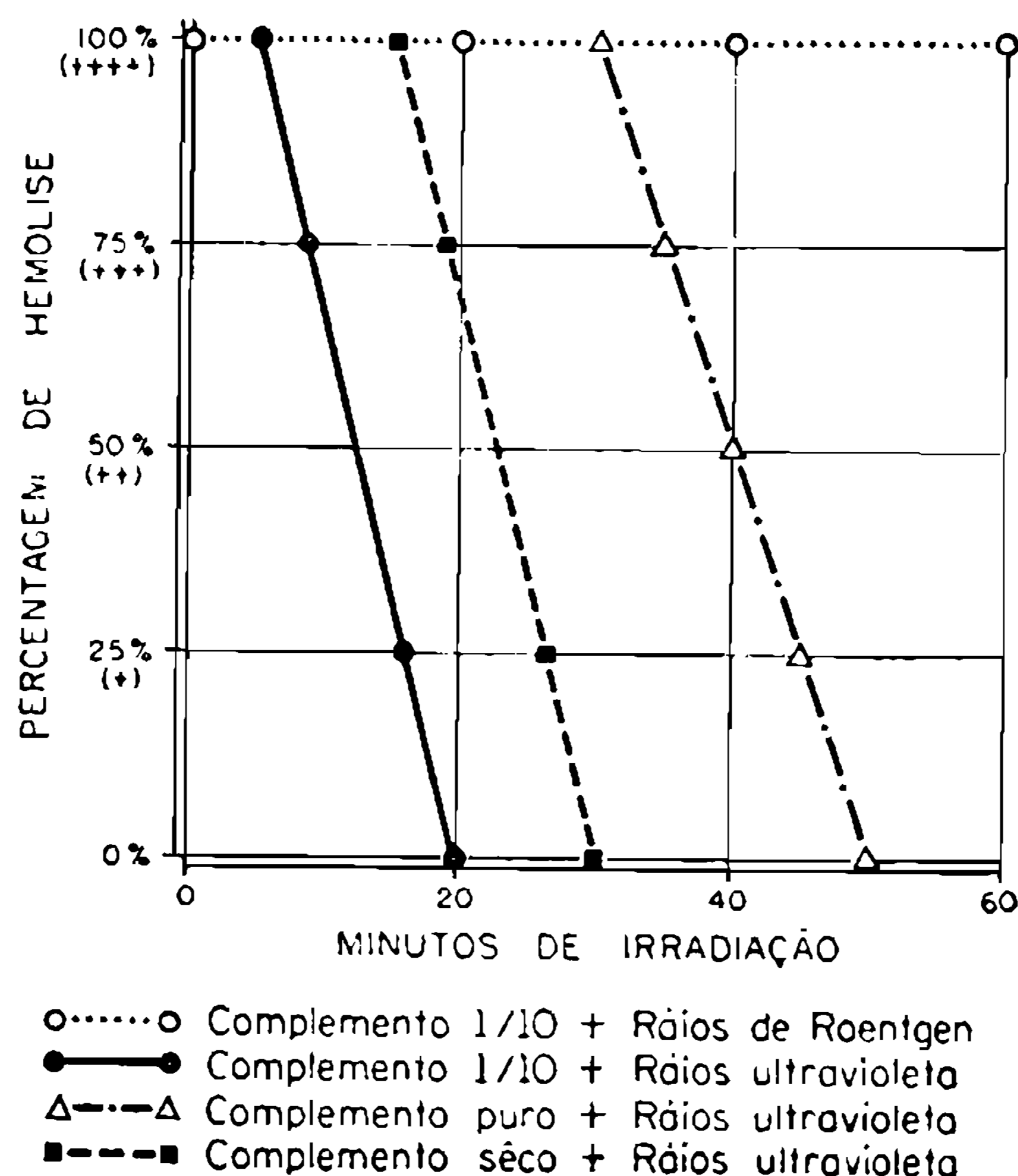
lítica, mesmo após sofrerem irradiações durante 1 hora (112.500 r) — (Vêr quadro I).

Contrariamente a êsses resultados negativos, obtidos com os raios X, os complementos sujeitos às radiações ultravioleta foram todos inativados, em período que variou com o estado de concentração que se encontravam no material irradiado. Assim, diluídos a 1:10, foram êles inativados após 20' de irradiação, quando no sôro sêco ,em 30', quando no sôro normal, sem diluição, em 50'.

Êsses resultados nos indicam que a concentração do complemento existente normalmente no sôro sangüíneo é aquela que melhores condições de proteção oferece ao complemento contra a ação das radiações ultravioleta.

QUADRO I

EFEITO DOS RÁIOS DE ROENTGEN E ULTRA-VIOLETA SÔBRE A ALEXINA OU COMPLEMENTO



Após verificação de que apenas as radiações ultravioletas inativam os complementos dos sôros dos animais estudados (cão, cavalo, homem, coelho, cobaio), procuramos determinar qual o componente complementar mais sensível a essas radiações e cuja destruição seria a responsável pela inativação do mesmo. Com êste fito, realizamos uma série de verificações conforme mostram os quadros III e IV. Que nos revelam ser a fração termo-labial do complemento a sensível às radiações ultravioletas, permanecendo as frações termo-estáveis íntegras, sem nenhuma alteração. Em seguida, verificou-se qual das frações termo-lábeis se destrói pela ação das radiações ultravioletas, sendo constatado ser a fração albumina (2.^o componente, C₂) do complemento, a sensível, e

que o complemento assim inativado pode ser prontamente regenerado pela simples adição dêste seu componente (C_2), íntegro.

A seguir, procuramos ainda determinar se o componente do complemento (C_2) inativado pelos raios ultravioleta poderia ser substituído por idêntico componente íntegro, mas proveniente de animal pertencente a espécie diversa daquela fornecedora do complemento inativado, com êste objetivo realizamos uma série de experiências constantes nos quadros IV, V, VI, VII, VIII, IX e X, sendo verificado ser em alguns casos possível obter-se a regeneração da fração inativada (C_2) por idêntica fração íntegra, proveniente de animal de espécie diversa da fornecedora do complemento inativado. Assim a fração albumina (C_2) de cobaio, mostrou ser capaz de regenerar o complemento inativado pelos raios ultravioleta do próprio cobaio, do homem e do cão, o do coelho muito pouco. Mas o complemento de cobaio inativado por essas radiações, não é regenerado pela fração albumina de nenhum dêstes animais, o sendo sòmente, pelo C_2 do próprio cobaio.

A fração albumina do complemento humano, mostrou-se capaz de regenerar o próprio complemento humano, inativado pelos raios ultravioletas, e, os complementos inativados do boi e do cavalo não sendo, no entanto, o complemento humano inativado refeito pela adição da fração albumina (C_2) proveniente dêstes dois animais.

As demais frações albuminas (C_2) experimentadas, (coelho, cavalo, boi e cão) se revelaram capazes de regenerar apenas o complemento inativado pelas radiações ultravioleta dos próprios animais de onde vieram.

Seguem-se os quadros:

QUADRO II

ANIMAL	Complemento 1:10 unidade complementar empregada	Sistema hemolítico 10 u. 2.5% h.	Resultados (testemunha) hemólise	Resultado após 20' ultra- violeta hemólise
Cão.....	0,4	1	+ + +	—
Cavalo.....	0,5	1	+ + +	—
Homem.....	0,5	1	+ + +	—
Coelho.....	0,4	1	+ + +	—
Boi.....	1,0	1	+ + +	—
Cobaio.....	0,2	1	+ + +	—

QUADRO III

ANIMAL	Unidade complementar	Material submetido à Ultravioleta 30' hemólise	Regeneração da fração termolabil (C ³ e C ⁴ destruída) hemólise	Regeneração da fração termoestável (C ¹ e C ² destruída) hemólise
Cão.....	0,4	—	+ + +	—
Cavalo.....	0,5	—	+ + +	—
Homem.....	0,5	—	+ + +	—
Coelho.....	0,4	—	+ + +	—
Boi.....	1,0	—	+ + +	—
Cobaie.....	0,2	—	+ + +	—

QUADRO IV

ANIMAL	Unidade complementar inativada u.v.	Regeneração do complemento-Fração albumina (C ²) hemólise	Regeneração do complemento-Fração globulina (C ¹) hemólise
Cão.....	0,4	+ + +	—
Cavalo.....	0,5	+ + +	—
Homem.....	0,5	+ + +	—
Coelho.....	0,4	+ + +	—
Boi.....	1,0	+ + +	—
Cobaio.....	0,2	+ + +	—

QUADRO V

ANIMAL	Unidade complementar inativada u.v.	Regeneração do complemento-Fração albumina (C ²) 0,4 de	Resultado hemólise
Cão.....	0,4	cão	+ + +
Cão.....	0,4	cobaio	+ + +
Cão.....	0,4	homem	—
Cão.....	0,4	cavalo	—
Cão.....	0,4	coelho	—
Cão.....	0,4	boi	—

QUADRO VI

ANIMAL	Unidade complementar inativada u.v.	Regeneração do complemento-Fração albumina (C ²) 0,5 de:	Resultado hemólise
Cavalo.....	0,5	cavalo	+ + +
Cavalo.....	0,5	cobaio	—
Cavalo.....	0,5	homem	+ + +
Cavalo.....	0,5	cão	—
Cavalo.....	0,5	coelho	—
Cavalo.....	0,5	boi	—

QUADRO VII

ANIMAL	Unidade complementar inativada u.v.	Regeneração do complemento-Fração albumina (C ²) 0,2 de:	Resultado hemólise
Cobaio.....	0,2	cobaio	+ + +
Cobaio.....	0,2	coelho	—
Cobaio.....	0,2	cavalo	—
Cobaio.....	0,2	homem	—
Cobaio.....	0,2	cão	—
Cobaio.....	0,2	boi	—

QUADRO VIII

ANIMAL	Unidade complementar inativada u.v.	Regeneração do complemento c/fração albumina (C ²) 0,5 de:	Resultado hemólise
Homem.....	0,5	homem	+ + +
Homem.....	0,5	cavalo	—
Homem.....	0,5	coelho	—
Homem.....	0,5	cobaio	+ + +
Homem.....	0,5	cão	—
Homem.....	0,5	boi	—

QUADRO IX

ANIMAL	Unidade complementar inativada u.v.	Regeneração do complemento c/fração albumina (C ²) 0,4 de	Resultado hemólise
Coelho.....	0,4	coelho	+ + +
Coelho.....	0,4	cavalo	—
Coelho.....	0,4	cobaio	+
Coelho.....	0,4	cão	—
Coelho.....	0,4	homem	—
Coelho.....	0,4	boi	—

QUADRO X

ANIMAL	Unidade complementar inativada u.v.	Regeneração do complemento c/fração albumina (C ²) 1,0 de:	Resultado hemólise
Boi.0.....	1,0	boi	+ + +
Boi.....	1,0	cavalo	—
Boi.....	1,0	cobaio	—
Boi.....	1,0	homem	+ + +
Boi.....	1,0	cão	—
Boi.....	1,0	coelho	—

CONCLUSÕES

Das verificações realizadas conclui-se que:

- 1) — A sensibilidade do complemento existente no sôro recente dos vários animais experimentados (cão, coelho, homem, cobaio, cavalo, e boi) as radiações de Roentgen e ultravioleta é idêntica;
- 2) — Os raios X não inativam o complemento de sôro mantido em temperatura constante (+ 10° C), durante a irradiação, enquanto que as radiações ultravioleta inativam o complemento em idênticas condições;
- 3) — A fração do complemento sensível às radiações ultravioleta é o seu segundo componente (fração albumina termo-labil, C₂);
- 4) — A regeneração da atividade do complemento inativado pelas radiações ultravioleta pode ser obtida pela adição de fração albu-

mina íntegra de outro componente não irradiado, que poderá ser proveniente de sôro de animal da própria espécie e, em alguns casos, oriundos de animais pertencentes a espécies diversas;

- 5) — A fração albumina do complemento de cobaio se mostrou capaz de regenerar os complementos inativados pelas radiações ultravioleta do próprio cobaio, do homem, do cão e parcialmente do coelho, não sendo no entanto o complemento de cobaio inativado nessas condições, regenerado pela fração albumina proveniente dos mesmos animais;
- 6) — A fração albumina do complemento humano, regenera o próprio complemento do homem, quando inativado pelas radiações ultravioleta, o do boi e do cavalo, não o sendo, no entanto, pela fração albumina proveniente do complemento dêsses dois animais.

SUMÁRIO

Foram procedidas verificações experimentais sôbre o complemento de vários animais (cão, coelho, cobaio, homem, cavalo e boi), visando se determinar a sensibilidade dos mesmos às radiações de Roentgen e ultravioleta.

Foi verificado que a temperatura constante de $+10^{\circ}\text{C}$, os complementos examinados, não apresentam modificações mesmo após terem sofrido a ação de 112.500 r. Outrossim, o mesmo não acontece quando são êles submetidos às radiações ultravioleta, a inativação que então se processa, varia em tempo de acôrdo com o grau de diluição do complemento no momento da irradiação. A seguir, se demonstrou que a fração complementar sensível a essas radiações é a fração albumina termolabil (segundo componente C_2).

Os complementos, assim, inativados podem readquirir as suas propriedades mediante a adição da fração albumina proveniente de complemento íntegro, não irradiado. A fração regeneradora pode pertencer a complemento de animal da mesma espécie, e, em alguns casos, a espécies diversas. Assim, a fração albumina do complemento de cobaio, se mostrou capaz de regenerar o complemento inativado do próprio cobaio, do homem, do cão e, parcialmente, o do coelho, não sendo, no entanto, regenerado por frações albumina originárias de complementos de nenhum dos referidos animais. A fração albumina do complemento humano se revelou capaz de regenerar o próprio complemento humano, o do boi e do cavalo, não sendo, no entanto, regenerado pela fração albumina íntegra proveniente de complemento dêsses dois animais.

SUMMARY

Where realized experimental observations about some animals complements (dogs, rabbits, guinea pigs, men, horses and cows), verificated the action of roentgen radiations and ultraviolet radiations about than.

It was found that the studied complements in constant temperature of 10° C, were not destroyed by the roentgen radiations (112.500 r).

The same thing did not happen those submitted under ultraviolet radiations, these were inactivitates. The time necessary for inativations, changes according with the degre of complements dilutions, when irradiateds.

It was found afterwords that the destroyed fraction is the albumin fraction (second component, C2). The complements so inativated might regenerate their properties by the adition of albumine fractions obtained of complements not irradiated. The regenerating fraction might belong to identical animals and some cases to animals of diferent species. The albumin fraction of guinea pig, complement regenerates the inativated complements of guinea pig, man, dog and partial rabbits, but it is not regenerated by the albumine fractions of their complements.

The albumin fraction of human complement regenerates the inativated complement of man, horse and cow, but it is not regenerated by the albumine fractions, of the last two animals.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — ABELIN S. STINER O.
— 1913. Die Einwirkung der ultravioletten Lichtes auf Komplement des Merschweinchenserums.
Zeits. Immunitat. und Exp. Therap. Orig. 19 : 1-8.
- 2 — BAERMAN. G. LINSSER P.
1904. Uber die lokale und allgemeine Wirkung der Rontgenstrahlen
Munch. Med. Wochensch. 51 : 996-999.
- 3 — BARONI V. JONESCO-MITHAESTI C.
1910. Sur la destruction par les rayons ultraviolets des principes actifs des serums normaux et preparés.
C. Rend. Soc. biol. 68 : 393-395.
- 4 — BRANN G.
1925. Beitrage zur Wirkung der Rontgen-Radium, un Ultraviolettstrahlen. auf Komponenten der Wassrmanschen Reaktion.
Zeitschr. Immunitat. und Exp. Therap. Orig. 44 : 27-32.
- 5 — COSTA CRUZ J. AZEVEDO -ENNA H.
1932. Ação do formol sôbre a alexina da cobaia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 26 : 85-97.
- 6 — COURMONT P. DUFORT A.
1913. Disparition de l'alexine des sérums par les rayons ultraviolets.
C. Rend. Soc. Biol. 74 : 1152-1153.
- 7 — FRANKEL E.
1912. Der einfluss der Rontgenstrahlen auf das hamolytische Komplement, des Merschweincheserum.
Berl. Klin. Wochensch. 49 : 2030-2032.

- 8 — FRIEDBURGER E. SCIMONE V.
1923. Zur Wirkung der ultraviolettenstrahlen auf Antikörper, Antigene auf die Komponenten der Wassermannschen Reaktion.
Z. Immunirersch. 37 : 341.
- 9 — FRIEDBULGER E.
Neitere Versuche Über ultravioletten Licht III Mitteilung.
Berl. Klin. Wochensch. 51 : 1402-1405.
- 10 — GORDON J. WITEHEAD H. R. WORMALL A.
1926. The action of amonia on complement. The fourth component.
Biochem. J. 20 : 1029-1935.
- 11 — SCAFFIDI V.
1915. Eifluse der Schuttelns, der ultraviolettenstrahlen und der Rontgenstrahlen auf das Komponent und hamolytischen Amboceptor.
Biochem. Zeitsch. 69 : 162-180.
- 12 — SCHUBERT J.
1928. Studien uber die ultraviolettenstrahlung von Tetanustoxin, Rizin hamolytischen Komplement un Fettsauren.
Zeitsch. Immunitat, und Exp. Therap. Orig. 58 : 106-122.
- 13 — SCHUBERT J.
1931. Komplementspaltung un Komplementwirkung.
Zentralb. Bakt. Orig. 122 : 82-86.
- 14 — ROCHA LAGÔA F.
1947. Ação dcs venenos de serpentes brasileiras sôbre a alexina ou complemento.
Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 4: : 441-449.
-