

## O COMPLEMENTO DO SÔRO HUMANO EM INDIVÍDUOS NORMAIS

Celeste FAVA Netto <sup>(1)</sup>, Antranik MANISSADJIAN <sup>(2)</sup>, Hedda Arminante de Oliveira PENNA <sup>(2)</sup>, Helcio Bahia CORRADINI <sup>(3)</sup> e Gabriel RUIZ Junior <sup>(3)</sup>

### RESUMO

Utilizando técnica rigorosa, na determinação em unidades 50% de hemólise, foi titulado o complemento nos seguintes grupos de indivíduos normais: homens adultos, mulheres adultas, puérperas e seus recém-nascidos. Os teores encontrados, expressos pelas médias e os respectivos desvios-padrão em cada grupo, foram os seguintes: para homens adultos 294,55 U/ml  $\pm$  13,34, para mulheres adultas 234,75 U/ml  $\pm$  10,26, para puérperas 301,55 U/ml  $\pm$  11,64 e para seus recém-nascidos 174,85 U/ml  $\pm$  12,53. Foi realizado estudo estatístico na verificação da significância das diferenças entre as médias encontradas em cada grupo.

### INTRODUÇÃO

O complemento, substância realmente complexa, constituída de várias frações proteicas, algumas das quais com atividades enzimáticas definidas, exerce no organismo humano papel ainda não bem conhecido. Na literatura médica, encontramos trabalhos que relacionam o teor de complemento do sôro com a atividade opsônica <sup>4</sup>, outros que referem a titulação do complemento sérico em moléstias infecciosas, no enfarte do miocárdio, em neoplasias várias, na tireotoxicose e na alergia a drogas <sup>2, 3, 7</sup> e resultados de pesquisas do teor de complemento em doenças de possível mecanismo auto-imune, como o lupus eritematoso sistêmico, a artrite reumatóide, a dermatomiosite, a esclerodermia, a periarterite nodosa, a febre reumática, a glomérulo-nefrite difusa, a púrpura anafilatóide e a anemia hemolítica adquirida <sup>1, 5, 6, 8, 12, 13</sup>.

Os Autores estão de acôrdo em admitir que as discordâncias, verificadas nos dife-

rentes trabalhos são, certamente, devidas a técnicas inadequadas de titulação do complemento. Os trabalhos em que as técnicas utilizadas foram mais rigorosas, titulando o complemento em unidades 50% de hemólise, são as de FISCHER & col.<sup>6</sup>, WEDGEWOOD & JANEWAY<sup>12</sup> e de WILLIAMS & LAW<sup>13</sup>.

No laboratório do Departamento de Microbiologia e Imunologia, a titulação do complemento, em unidades 50% de hemólise, é feita por técnica diferente daquelas empregadas pelos Autores citados. Por êste motivo, realizamos a presente pesquisa, para determinar, pelo método por nós utilizado, o teor do complemento sérico em indivíduos normais.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Soros** — O sangue foi colhido em jejum, com agulha e seringa secas e deixado coagu-

O presente trabalho foi subvencionado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo Departamento de Microbiologia e Imunologia (Prof. Carlos da Silva Lacaz) e Clínica Pediátrica (Prof. substituto Eduardo Marcondes) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil

- (1) Professor assistente docente
- (2) Assistentes da Clínica Pediátrica
- (3) Médicos assistentes

lar à temperatura ambiente, separando-se o sôro no máximo até 3 horas após a colheita. O sôro, separado esterilmente, era utilizado em seguida ou congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Na maior parte das vêzes, o complemento foi titulado no mesmo dia da colheita do sangue. Quando de sôro congelado, o complemento foi titulado, no mais tardar, 4 dias após a colheita. Foi colhido sangue de 20 homens adultos normais, de 20 mulheres adultas normais, de 20 puérperas e de seus recém-nascidos.

*Solução fisiológica* — Todos os elementos da reação foram diluídos em solução de cloreto de sódio quimicamente puro a 0,85%.

*Hemácias de carneiro* — Colhidas e preservadas em solução A.C.D. Usamos sempre hemácias de dois carneiros, que foram utilizadas sômente 4 dias após a colheita. Após serem lavadas três vêzes em grandes volumes de solução fisiológica por centrifugação, as hemácias eram ressuspensas em solução fisiológica, filtradas em algodão hidrófilo e centrifugadas novamente a 2.000 r/m durante 10 minutos. Do sedimento assim obtido preparava-se suspensão a 5% das hemácias em solução fisiológica. A suspensão era então padronizada em colorímetro foto-eléctrico (Evans electroselenium), de tal modo que, 0,1 ml da suspensão de hemácias, lisadas em 0,9 ml de água destilada, davam densidade óptica igual a 0,54 ou 0,56 com filtro verde-amarelado.

*Hemolisina* — Sôro de coelho anti-hemácias de carneiro preparado pela técnica de ULRICH & MAC ARTHUR<sup>9</sup> e utilizado em concentração ótima, isto é, em tal quantidade que nôvo acréscimo de hemolisina não aumenta o grau de hemólise. Esta, em tais condições, depende unicamente da quantidade de complemento presente.

*Técnica da titulação* — Inicialmente eram preparadas três diluições do sôro em estudo em solução fisiológica gelada, 1:20, 1:40 e 1:60. As diluições eram feitas em pequenos frascos que eram mantidos em banho gelado. Para cada diluição do sôro era utilizada uma série de 9 tubos de ensaio  $12 \times 75$  mm, padronizados para leitura fo-

to-colorimétrica. Pipetavam-se para cada tubo da série as seguintes quantidades da diluição do sôro: 0,06; 0,09; 0,12; 0,15; 0,18; 0,21; 0,24; 0,27 e 0,30 ml. Em seguida eram completados os volumes em cada tubo para 0,3 ml com solução fisiológica gelada. A mesma operação era repetida para as três séries de 9 tubos, uma para cada diluição do sôro. A seguir, acrescentava-se, a todos os tubos, 0,2 ml do sistema hemolítico preparado 10 minutos antes, misturando-se volumes iguais de suspensão de hemácias padronizadas e de hemolisina em diluição ótima. Após agitação, as estantes eram incubadas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , durante 15 minutos. Em seguida, acrescentava-se a todos os tubos 0,5 ml de solução fisiológica gelada e, após agitação adequada, eram centrifugados a 2.000 rotações por minuto, durante 5 minutos. Procedia-se, então, à leitura foto-colorimétrica, para avaliação do grau de hemólise em cada tubo.

A determinação da quantidade de sôro que dava 50% de hemólise era feita graficamente, inscrevendo-se os logaritmos das quantidades de sôro contra os logitos de hemólise em cada tubo, de acôrdo com a transformação logarítmica da fórmula de Von KROCH,

$$\log x = \log K + n \log \left( \frac{y}{1-y} \right).$$

A técnica utilizada em nosso laboratório corresponde àquela desenvolvida por WADSWORTH, MALTANER & MALTANER e que se encontra descrita no Standard Methods<sup>10</sup>.

Geralmente, com as diluições do sôro que empregamos, conseguíamos a inscrição de duas retas no gráfico, de tal modo que, a quantidade absoluta de sôro necessária para 50% de hemólise podia ser calculada a partir de duas diluições iniciais. Estas quantidades, quando diferentes, foram sempre muito próximas e tomava-se a média como sendo a quantidade absoluta de sôro que dava 50% de hemólise.

Dividindo 1 pela quantidade absoluta de sôro humano que dava 50% de hemólise, obtinha-se o número de unidades de complemento contidas em 1 ml de sôro.

### RESULTADOS

Os resultados obtidos, nos vários grupos estudados, estão referidos no Quadro I em unidades (50% de hemólise) de complemento por ml de soro. No mesmo quadro são encontradas as médias para cada grupo e os desvios-padrão das médias.

A diferença entre as médias nos grupos de homens adultos e de mulheres adultas é estatisticamente significativa ao nível de  $P = 0,05$ . A diferença entre as médias de homens adultos e puérperas não é significativa ao nível de  $P = 0,05$ . A diferença

QUADRO I

Unidades (50% de hemólise) de complemento por ml de soro

Homens	Mulheres	Puérperas	Recém-nascidos
187	163	207	100
211	196	222	103
245	197	235	104
251	198	250	125
253	198	260	133
258	200	272	144
272	204	278	150
272	210	278	159
273	216	281	167
282	226	298	167
297	227	306	171
300	243	307	174
305	249	333	180
307	256	336	185
316	262	338	194
328	271	350	202
340	275	364	203
347	280	364	244
418	282	366	268
429	342	386	324
$\bar{X} = 294,55$ $\pm 13,34$	$\bar{X} = 234,75$ $\pm 10,26$	$\bar{X} = 301,55$ $\pm 11,64$	$\bar{X} = 174,85$ $\pm 12,53$

entre as médias de puérperas e seus recém-nascidos é significativa ao nível de  $P = 0,001$ .

### DISCUSSÃO

O conhecimento do teor normal de complemento do soro humano, quando titulado por uma determinada técnica, é indispensável, como dado inicial, para o estudo das variações que possam ocorrer em várias condições mórbidas. Neste estudo, nossa atenção foi despertada, de início, para as grandes diferenças de teor, em complemento, nos soros das mães e dos recém-nascidos. Geralmente recém-nascido, apresentava título que era aproximadamente igual à metade daquele encontrado no soro materno. Outra verificação interessante foi a de que o teor de complemento no soro das mulheres adultas normais era significativamente mais baixo que o encontrado no soro dos homens adultos normais. Este fato nos pareceu tão estranho que repetimos a titulação do complemento em mais 20 mulheres adultas normais e a média que encontramos, de 237,5 U/ml, está bem dentro do desvio padrão da média para o grupo. Procurando verificar ao mesmo tempo a reprodutibilidade das titulações e as possíveis variações do teor de complemento no soro de um mesmo indivíduo, fizemos em um voluntário, num período de 19 dias, seis titulações do complemento, sendo que, o sangue foi colhido no mesmo período do dia tôdas às vêzes. O teor variou entre 242 e 250 U/ml, dando a diferença máxima de 8 U/ml.

Considerando-se o rigor com que se titula o complemento pela técnica empregada, podemos concluir que o teor normal de complemento do soro humano varia de indivíduo para indivíduo, sendo mais baixo, quanto às médias, nos grupos das mulheres adultas normais e dos recém-nascidos. Dentro de cada grupo se tomarmos 100 unidades para baixo e para cima da média, verificamos que abrangeremos praticamente todos os indivíduos. Em condições mórbidas, como a glomérulo-nefrite difusa aguda, a diminuição do teor de complemento é muito grande, chegando a ser bem menor que 100 U/ml. Além do mais, a titulação do complemento nas condições mórbidas, apresenta

grande interêsse para acompanhar a evolução de um caso isolado. Verifica-se, então, que a melhora clínica é acompanhada pela normalização do teor de complemento no sôro.

Finalmente, queremos assinalar que a técnica de titulação do complemento, em unidade 50% de hemólise, por nós utilizada, permite revelar no sôro humano um número maior de unidades, que aquelas empregadas em trabalhos anteriores: de FISCHER & col.<sup>6</sup>, 37,7 U/ml  $\pm$  3,9; de WEDGEWOOD & JANEWAY<sup>12</sup>, 47,7 U/ml  $\pm$  13,3; de WILLIAMS & LAW<sup>13</sup>, 44 U/ml  $\pm$  4,7 e de WALTON & ELLIS<sup>11</sup>, unidades arbitrárias. Este fato talvez a torne mais interessante no estudo evolutivo dos pacientes, permitindo verificar com mais detalhes as variações no teor de complemento, que ocorrem na evolução do estado mórbido.

Para complementação do presente trabalho será necessário determinar-se em que época da vida o teor de complemento dos recém-nascidos passa a ser igual ao dos adultos.

#### SUMMARY

##### *The complement of human serum in normal individuals*

The complement of human serum was titrated, by a technique of 50% hemolysis, in the following groups of normal individuals; men, women, puerperae and their newborns.

The media in units per ml of serum were the following: for men 294.55 U/ml  $\pm$  13.34; for women 234.75 U/ml  $\pm$  10.26; for puerperae 301.55 U/ml  $\pm$  11.64 and for their newborns 174.85 U/ml  $\pm$  12.53.

The significance of differences between the media in these groups was tested by a statistical analysis.

#### AGRADECIMENTOS

Os Autores agradecem ao Prof. Lindo Fava, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras da Universidade de São Paulo, pela sua valiosa colaboração, realizando o estudo estatístico.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. De GARA, P. F. & GOLDBERG, H. P. — Immunologic and biochemical studies in infants and childrens with special reference to rheumatic fever. III — Complement titers in abnormal conditions. *Pediatrics* 2: 248-254, 1948.
2. ECKER, E. E.; SEIFTER, S. & DOZOIS, T. F. — Human complement. *J. Lab. Clin. Med.* 30:39-50, 1945.
3. ECKER, E. E.; SEIFTER, S.; DOZOIS, T. F. & BARR, L. — Complement in infectious disease in man. *J. Clin. Invest.* 25:800-808, 1946.
4. ECKER, E. E. & LOPEZ-CASTRO, G. — Complement and opsonic activities of fresh human sera. *J. Immunol.* 55:169-181, 1947.
5. ELLIS, H. A. & WALTON, K. W. — Variations in serum complement in the nephrotic syndrome and other forms of renal disease. *Immunology* 1:234-250, 1958.
6. FISCHER, E. E.; PAULI, R. H. & LESH, J. — Serological studies in rheumatic fever. II — Serum complement in rheumatic state. *J. Clin. Invest.* 28:1172-1181, 1949.
7. FISCHER, E. E. — Serum complement as an indication of the presence and degree of inflammatory reaction in various diseases. *J. Clin. Invest.* 32:568, 1953.
8. LANGE, K.; WASSERMAN, E. & SLOBODY, L. B. — The significance of serum complement levels for the diagnosis and prognosis of acute and subacute glomerulonephritis and lupus erythematosus disseminatus. *Ann. Intern. Med.* 53:636-646, 1960.
9. ULRICH, C. A. & MAC ARTHUR, F. X. — An improved method for the production of anti-sheep hemolysin. *Amer. J. Clin. Path.* (Suppl.) 12:84-85, 1942.
10. WADSWORTH, A. B. — *Standard methods of the division of laboratories and research of the New York State Department of Health.* Baltimore, William & Wilkins, 1947.
11. WALTON, K. W. & ELLIS, H. A. — A method for serial determinations of serum complement. *Immunology* 1:224-233, 1958.
12. WEDGEWOOD, R. J. P. & JANEWAY, C. R. — Serum complement in children with "colagen diseases". *Pediatrics* 11:569-581, 1953.
13. WILLIAMS, R. C. & LAW, D. H. — Serum complement in connective tissue disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 52:273-281, 1958.