

ESTUDO PARALELO DO COMPLEMENTO E DA IMUNOCONGLUTININA DO SORO HUMANO EM INDIVÍDUOS NORMAIS

Lucia M. SINGER (1), Natalino Hajime YOSHINARI (2), Maria Aparecida Telles GUERRA (2) e Celeste FAVA NETTO (3)

RESUMO

Foram dosados simultaneamente o complemento total e a imunoconglutinina nos soros obtidos de 18 indivíduos adultos normais de 20 a 28 anos. Várias amostras de sangue foram colhidas de cada indivíduo durante período de tempo que se prolongou até 3 meses e meio. Tais titulações permitiram concluir que o teor de complemento sérico é uma característica individual que varia pouco em condições normais. Assim o teor sérico do complemento diminui alguns dias antes do aparecimento dos sinais e sintomas que caracterizam intercorrências infecciosas, tais como resfriado, gripe, infecções dentárias etc. A titulação simultânea da imunoconglutinina demonstrou aumento significativo de seu teor alguns dias após a queda do teor de complemento sérico, o que está de acordo com as verificações de que a imunoconglutinina é um anticorpo contra as frações C₃ e C₄ do complemento.

INTRODUÇÃO

O complemento (C) constitui um sistema complexo de fatores séricos, de nove componentes (ou 11 proteínas séricas distintas), que tem a capacidade de se ligar a complexos antígeno-anticorpo, e de determinar alterações irreversíveis das membranas celulares. Os componentes do complemento interagem na seguinte ordem: C₁, C₄, C₂, C₃, C₅, C₆, C₇, C₈ e C₉, sendo que o C₁ é composto de 3 proteínas, C_{1q}, C_{1r} e C_{1s} unidas pelo cálcio.

Os fatores que reagem com o C fixado num complexo antígeno-anticorpo são de duas categorias: 1) *Conglutinina*, que é uma proteína encontrada em bovinos e que reage especificamente com um determinante do C₃ fixado; 2) *Imunoconglutininas* (IK) que são anticorpos, principalmente do tipo IgM, que provavelmente ocorrem em todas as espécies; estes anticorpos são específicos para determinantes de C₃ e C₄ fixados. Foi feita recente-

mente uma revisão sobre congulutinina e imunoconglutininas por LACHMANN⁷.

Para a titulação do C total pode-se lançar mão de vários métodos, dos quais citaremos os seguintes: FISCHER & col.⁵, WEDGEWOOD & JANEWAY¹³; WILLIAMS & LAW¹⁴, MAYER⁹ e FAVA NETTO & col.⁴. Utilizando os métodos padronizados de titulação do C e conhecendo o teor normal, os Autores fizeram numerosas pesquisas, procurando demonstrar alterações do C, titulado como um todo no soro de pacientes de várias entidades mórbidas.

Na revisão de SCHUR & AUSTEN¹¹ estão relacionados os trabalhos feitos sobre o C em vários estados patológicos tratando tanto de dosagens do C total, como de frações do C.

Também a imunoconglutinina (IK) foi pesquisada em vários estados patológicos, por MARKS & COOMBS⁸, JASSER & BRACIEL⁶,

(1) Assistente do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Brasil

(2) Bolsista da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Processos 71/1019

(3) Professor Adjunto de Microbiologia e Imunologia do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil

CASPARY & BALL², BIENENSTOCK & BLOCH¹ e NGU & SOOTHILL¹⁰.

Nossos propósitos foram: 1) Observar se o C é uma característica individual, dado que FAVA NETTO & col.⁴ fizeram 6 titulações do C de um mesmo indivíduo e o seu teor teve variação muito pequena (entre 242 U/ml e 250 U/ml), enquanto que titulações do C de 40 indivíduos adultos (20 homens e 20 mulheres) apresentaram títulos variando entre 163 U/ml e 429 U/ml; 2) Estudar a relação que há entre as variações do título do C e da IK em indivíduos sadios.

MATERIAL E METODOS

Dezoito voluntários (15 homens e 3 mulheres) de 20 a 28 anos, doaram pelo menos cinco amostras de sangue cada um, em datas variadas.

Para a dosagem do C, os soros foram titulados no mesmo dia da colheita do sangue.

Para a titulação da IK, os soros foram guardados em congelador a (-20°C) até a realização da experiência.

O método usado para a titulação do C foi o de FAVA NETTO & col.⁴.

A titulação da IK foi realizada segundo o método IIb, técnica de COOMBS & col.³ sendo que foi usada uma das técnicas de diluição descrita no "Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of the New York State Department of Health"¹², na qual as diluições finais do soro são: 1/1 — 1/1,67 — 1/2,5 — 1/5 — 1/8,3 — 1/12,5 — 1/25 — 1/41,7 e 1/62,5.

Foi feita também mistura de soros de pacientes com doenças autoimunes e com infecções variadas; essa mistura foi guardada em congelador em pequenas alíquotas a fim de se observar a reprodutibilidade da titulação da IK. Cada dia que se realizava nova titulação da IK, incluía-se uma amostra desta mistura de soros.

RESULTADOS

1) *Variações individuais do C* — Foram selecionados 18 indivíduos adultos normais, que doaram amostras de sangue durante um período de tempo relativamente longo, chegando ao máximo de 3 meses e meio. É natural que tivessem ocorrido na maioria deles, pequenas intercorrências infecciosas (gripes,

TABELA I
Média e desvios-padrões dos títulos do C

Doador	Computando todas as titulações do C		Excluindo as titulações feitas na vigência de infecções, assim como uma semana antes e uma semana depois da infecção	
	Média dos títulos do C	Desvio-padrão dos títulos do C	Média dos títulos do C	Desvio-padrão dos títulos do C
E.C.	203,60	24,13	203,60	24,13
L.A.	246,75	24,75	259,00	13,12
M.Q.S.	198,43	24,57	199,92	20,44
M.T.A.	217,82	20,05	224,86	15,46
W.S.N.	246,60	20,80	241,33	19,63
A.T.F.	219,94	20,05	217,64	18,92
M.R.V.S.	214,87	29,40	207,57	22,59
W.	207,86	17,97	207,90	17,97
A.C.B.A.	187,95	16,14	187,95	15,34
R.	187,62	23,42	191,50	16,70
M.A.R.	232,33	22,30	239,17	17,16
P.P.	238,33	13,08	238,33	13,08
A.D.C.S.	226,10	29,41	234,00	16,10
N.H.J.	182,33	20,80	187,50	13,83
R.J.M.	207,00	26,54	197,50	17,08
V.W.R.S.	231,05	37,50	242,19	17,80
M.A.G.G.	227,50	35,70	208,60	32,32
S.	276,70	29,20	276,70	28,23

TABELA I I

Titulos máximos e mínimos do C de cada doador, não se computando as titulações feitas na vigência de infecções, assim como uma semana antes e uma depois da infecção

Doador	Título máximo do C (unidades 50% de hemólise/ml)	Título mínimo do C (unidades 50% de hemólise/ml)
E.C.	240,5	168,0
L.A.	277,0	242,0
M.Q.S.	219,0	171,0
M.T.A.	250,0	200,0
W.S.N.	269,0	215,5
A.T.F.	238,0	186,5
M.R.V.S.	238,0	172,5
W.	227,0	181,0
A.C.B.A.	213,5	166,5
R.	219,0	175,0
M.A.R.	260,0	210,0
P.P.	256,0	227,0
A.D.C.S.	260,0	219,0
N.H.J.	213,5	172,0
R.J.M.	227,0	163,0
V.W.R.S.	271,0	214,0
M.A.G.G.	257,0	172,0
S.	305,0	243,5

TABELA I I I

Titulações do C e da IK do doador P.P.

Data da titulação do C	Título do C (unidades 50% de hemólise/ml)	Título da IK (recíproca da diluição)
15-3-71	256,0	1,67
22-3-71	250,0	0,0
29-3-71	227,0	1,67
12-4-71	227,0	1,0
20-4-71	243,0	0,0
27-4-71	227,0	1,0

resfriados, infecções dentárias, faringites etc.), que foram assinaladas com a finalidade de esclarecer as suas interferências sobre o teor normal do C.

Na Tabela I, colunas 2 e 3 respectivamente apresentamos as médias e os desvios-padrões quando se computavam todas as titulações feitas, inclusive aquelas realizadas na vigência de infecções corriqueiras.

Na coluna 4 da Tabela I estão as médias dos resultados obtidos quando as intercorrências não estavam presentes. Para tal excluímos os

TABELA I V

Titulações do C e da IK do doador A.D.C.S.

Data da titulação do C	Título do C (unidades 50% de hemólise/ml)	Título da IK (recíproca da diluição)
15-3-71	250,0	0,0
22-3-71	223,0	0,0
29-3-71 (*)	152,5	1,0
12-4-71	245,5	5,0
19-4-71	223,0	5,0
27-4-71	219,0	0,0
03-5-71	223,0	1,67
11-5-71	260,0	2,5
02-6-71	240,0	2,5
08-6-71 (**)	225,0	2,5

(*) Gripe desde 5-4-71 até 9-4-71

(**) Gripe desde 9-6-71

resultados de titulações obtidas uma semana antes e uma semana depois das manifestações clínicas. Na coluna 5 estão os respectivos desvios-padrões.

Na Tabela II apresentamos também o valor máximo e mínimo do C de cada indivíduo, na qual não se levou em conta as titulações feitas durante infecções, assim como uma semana antes e uma depois da infecção.

O teste *t* de Student revelou que o C está significativamente diminuído ($p = 1\%$) alguns dias antes do aparecimento de sinais e sintomas de infecções intercorrentes. O mesmo teste não revelou para o C alterações estatisticamente significantes, durante e após o aparecimento dos sintomas.

As variações individuais quando não existe nenhuma intercorrência infecciosa estão exemplificadas na Tabela III, coluna 2 (doador P.P.). Já quando existe intercorrências infecciosas, as variações do C individual estão exemplificadas na Tabela IV, coluna 2 (doador A.D.C.S.).

Devemos ainda observar que no trabalho de FAVA NETTO & col. ⁴ a média e o desvio-padrão dos títulos de C em homens e mulheres foi respectivamente $264,65 \pm 85,09$.

2) *Variações individuais* da IK — Na Tabela V, colunas 2 e 3, encontram-se as médias e os desvios-padrões respectivos, das titulações da IK quando se computava todas as titulações realizadas, inclusive aquelas feitas durante a vigência de infecções corriqueiras. Nas colunas 4 e 5 apresentamos as médias da

TABELA V

Medidas e desvios-padrões dos títulos de IK

Doador	Computando todas as titulações de IK		Excluindo-se dias de infecção, assim como qualquer titulação feita até 10 dias após e 5 dias antes	
	\bar{X}	S_x	\bar{X}	S_x
E.C.	1,72	0,65	1,63	0,62
L.A.	2,23	1,28	2,31	1,36
M.Q.S.	3,89	3,70	2,50	1,66
M.T.A.	2,80	3,94	0,86	1,06
W.S.N.	1,53	0,77	1,44	0,91
A.T.F.	3,33	2,26	3,45	2,41
M.R.V.S.	1,31	0,85	1,31	1,17
W.	2,87	1,58	2,87	1,58
A.C.B.A.	3,69	2,82	3,37	2,54
R.	2,76	2,60	2,03	1,57
M.A.R.	2,34	2,73	0,89	0,75
P.P.	0,89	0,75	0,89	0,75
A.D.C.S.	2,02	1,88	1,11	1,25
N.H.J.	0,68	0,80	0,80	0,89
R.J.M.	0,76	0,97	0,85	1,00
V.W.R.S.	3,33	1,44	2,86	0,94
M.A.G.G.	1,71	1,36	2,00	1,50
S.	2,50	0,00	2,50	0,00

IK e os respectivos desvios-padrões quando excluíamos os dias de infecção, assim como qualquer titulação feita 5 dias antes e 10 dias após a ocorrência da infecção.

Das 121 titulações de IK feitas na ausência de infecções, 20 (16,5%) não revelam IK, 27 (22,3%) apresentaram título 1/1, 27 (22,3%) apresentaram título 1/1,67, 34 (28,1%) apresentaram título 1/2,5, 11 (9,1%) apresentaram título 1/5 e apenas 2 (1,6%) apresentaram título 1/8,3.

Das 155 titulações de IK feitas no total (incluindo-se aquelas realizadas na vigência de infecções), 25 (16,1%) tinham um título igual ou maior que 1/5, sendo que havia dois casos com título 1/12,5.

O teste *t* de Student revelou que o título da IK acha-se significativamente ($p = 5\%$), mais alto no período compreendido entre 5 dias antes e 10 dias após a intercorrência infecciosa.

O mesmo teste também revelou que o título da IK é significativamente mais alto ($p = 5\%$) no dia em que há uma baixa do título do C, seja pelo aparecimento de infecção, seja uma baixa do C sem motivo aparente. Tais resultados foram retirados dos dados obtidos

durante a presente pesquisa, e não se encontram assinalados em nossas tabelas.

DISCUSSÃO

FAVA NETTO & col.⁴ observaram em 40 indivíduos sadios, que os títulos de C sérico variaram entre 163 U/ml e 429 U/ml, sendo a diferença entre o título máximo e mínimo de 266 U/ml. A média e o desvio-padrão obtidos a partir dos resultados que publicaram são de 264,65 U/ml \pm 85,09.

No presente trabalho, em que analisamos as variações individuais do C, observamos que a maior diferença entre o título máximo e mínimo do C foi de 85 U/ml (doador M.A.G.G.) sendo que a maioria dos doadores apresentavam uma diferença de cerca de 50 U/ml. O maior desvio-padrão, não se computando os dias de infecção, assim com uma semana antes e uma depois da infecção, foi de 32,3 (doador M.A.G.G.), e o menor desvio-padrão foi de 13,08 (doador P.P.).

Mesmo computando todas as titulações feitas, sem excluir os dias de infecção, o maior desvio-padrão foi de 37,50 (doador V.W.R.S.), que é bem menor que o desvio-padrão encon-

trado para homens e mulheres sãos, por FAVA NETTO & col.⁴

Todos estes dados nos mostram que a variação individual do título do C é bem menor que aquela que encontramos na população. Isto nos leva a crer que o título do C é uma característica individual.

De nossa pesquisa resultou a verificação de que o teor do C sérico se encontra diminuído alguns dias antes do aparecimento dos sinais e sintomas próprios da intercorrência infecciosa. Tal fato nos parece de difícil explicação pois não é fácil admitir ou excluir o consumo do C pelo seu envolvimento na reação antígeno-anticorpo durante o período prodrômico ou de incubação das infecções.

As verificações contidas na investigação assumem grande importância principalmente quando se considera que o teor de C sérico apresenta grande valor no estudo evolutivo dos pacientes de determinadas doenças.

Os Autores que observaram o teor normal de IK no soro humano, encontraram diferentes resultados. MARKS & COOMBS⁸, observaram em 2597 soros que 64% dos soros não continham IK revelável ou tinham título 1/1, e que 13% dos soros apresentavam título de IK maior que 1/4. CASPARY & BALL² titulando a IK nos soros de 43 indivíduos normais observaram que 40% destes soros tinha título 1/4, e que a maioria dos soros tinha título variando entre 1/1 e 1/8. JASSER & BRAGIEL⁶ observaram em 1200 doadores que o título médio da IK sérica era de 1/6. BIENENSTOCK & BLOCH¹ encontraram em 50 indivíduos normais, títulos de IK sérica semelhante ao de JASSER & BRAGIEL⁶ e de CASPARY & BALL²: 68% dos indivíduos tinham título 1/4 ou 1/8 de IK sérica. NGU & SOOTHILL¹⁰ observaram em 47 indivíduos normais, que somente 8,5% tinham título de IK sérica igual ou maior que 1/2.

Titulando 121 soros de 18 indivíduos sadios na ausência de intercorrências infecciosas, observamos que a maioria (89, 2%) tinham títulos de IK variando entre 0 e 1/2,5, e que o título médio de IK sérica nestes indivíduos foi de 1/1,9.

No entanto, quando titulamos os soros durante intercorrências infecciosas, assim como 5 dias antes e/ou 10 dias depois, obtivemos maior número de soros com títulos superiores

a 1/2,5, e o título médio de IK sérica nestas condições foi de 1/2,5.

A discrepância de resultados entre os diversos Autores pode ser devido a falta de homogeneidade na escolha dos doadores, podendo muitos deles estar sofrendo pequenas infecções ou terem tido pequenas intercorrências infecciosas há pouco tempo, o que elevaria o título da IK sérica.

Observamos que há correspondência entre o aumento da IK sérica e a diminuição do complemento total, sendo que esta diminuição se verifica alguns dias antes do aumento de IK. Tal observação está de acordo com a aceitação generalizada de que a IK é anticorpo contra as frações do complemento C₃ e C₄, sendo que, o estímulo antigênico seria o complemento fixado.

SUMMARY

Parallel studies of total complement and immunoconglutinin in the sera of normal individuals

The total serum complement and immunoconglutinin were titrated in the sera of 18 normal adults humans, 20 to 28 years old. Many samples were collected from each individual for a period of time as long as 3 1/2 months.

From these data it was possible to conclude that the total serum complement is an individual character, prone to only minor variations in normal conditions. A decrease can appear some days before the onset of symptoms of infections like common cold, influenza, tooth infection and so on.

The simultaneous titration of immunoconglutinin reveals a rise in the titer, some days after the decrease in the complement titer. This fact is in accordance with the assumption that the immunoconglutinin is an antibody against C₃ and C₄ complement fractions.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BIENENSTOCK, J. & BLOCH, K. J. — Immunoconglutinin in various rheumatic diseases and certain diseases suspected of an autoimmune pathogenesis. *Arthritis Rheum.* 10: 187-198, 1967.
2. CASPARY, E. A. & BALL, E. J. — Serum immunoconglutinin in multiple sclerosis, Hashimoto's disease, and rheumatoid arthritis. *Brit. Med. J.* 2:1514-1515, 1962.

SINGER, L. M.; YOSHINARI, N. H.; GUERRA, M. A. T. & FAVA NETTO, C. — Estudo paralelo do complemento e da imunoconglutina do soro humano em indivíduos normais. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 15:14-19, 1973.

3. COOMBS, R. R. A.; COOMBS, A. M. & INGRAM, D. G. — *The serology of conglutination and its relation to disease*. Oxford, Blackwell, 1961.
4. FAVA NETTO, C.; MANISSADJIAN, A.; PENNA, H. A. O.; CORRADINI, H. B. & RUIZ JÚNIOR, G. — O complemento do soro humano em indivíduos normais. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:37-40, 1966.
5. 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.
6. JASSER, S. & BRAGIEL, I. — The phenomenon of conglutination in human sera. *Arch. Immun. Ther. Exp.* 10:103-108, 1962.
7. LACHMANN, P. — Conglutinin and Immunoconglutinins. *Adv. Immun.* 6:479-527, 1967.
8. MARKS, J. & COOMBS, R. R. A. — The conglutination phenomenon. XI. Immunoconglutinin in human sera. *J. Hyg.* 55:81-90, 1957.
9. MAYER, M. M. — *Experimental Immunochemistry* (Ed. E. A. Kabat & Mayer, M. M.) 2nd ed. Springfield, Charles C. Thomas, 1961, pp. 135-139.
10. NGU, J. L. & SOOTHILL, J. F. — Immunoconglutinin and complement changes in children with acute nephritis. *Clin. Exp. Immunol.* 5:557-566, 1969.
11. SCHUR, P. H. & AUSTEN, F. K. — Complement in human disease. *Ann. Rev. Med.* 19:1-24, 1968.
12. WADSWORTH, A. B. — *Standard Methods of the Division of Laboratories and Research of New York State Department of Health*. Baltimore, Williams & Wilkins, 1947.
13. WEDGEWOOD, R. J. P. & JANEWAY, C. R. — Serum complement in children with collagen diseases. *Pediatrics* 11:569-581, 1953.
14. WILLIAMS, R. & LAW, D. H. — Serum complement in connective tissue disorders. *J. Lab. Clin. Med.* 52:273-281, 1958.

Recebido para publicação em 7/6/1972.