

## Estudos sôbre o complemento

### II. — Análise eletroforética do complemento inativado pelas radiações ultravioleta

por

**F. Rocha Lagôa e H. T. Cardoso**

Foi demonstrado em trabalho anterior, que o complemento inativado pelas radiações ultravioleta sofre modificação em seu segundo componente (C2) de sua fração termo-labil. Essas verificações foram feitas em complementos existentes em sôros recentes de animais pertencentes a diversas espécies (homem, cão, cobaio, coelho, cavalo e boi). Os complementos inativados pela ação dessas radiações, readquirem tôdas as suas propriedades, se lhes fôr adicionada fração albumina (segundo componente, cadeia terminal da sua fração termo-labil, C2), obtida de complemento não irradiado. Dentre os complementos estudados, foi a fração albumina (C2) do de cobaio que revelou capacidade de regenerar maior número de complementos inativados pelas radiações ultravioleta, como o do homem, cão, coelho e o do próprio cobaio.

Considerando a importância nos domínios da imunologia de esclarecimentos sôbre o que se denomina por complemento, resolvemos encetar a análise eletroforética do mesmo, através da apreciação da sua fração sensível às radiações ultravioleta.

#### MATERIAL E MÉTODOS

O complemento utilizado foi o de cobaio, sempre obtido de sôro recente, diluído a 1/10 em água fisiológica esteril. A obtenção do segundo componente dêste complemento (fração albumina termo-labil, C2), foi realizada pelo método de LIEFMANN (corrente de CO<sub>2</sub> em solução gelada em água destilada contendo sôro recente, diluído a 1/10; após precipitação da fração globulina (C1) e retirada da mesma centrifugação, foi eliminado o CO<sub>2</sub> existente no sobrenadante que contém a fração albumina (C2) e refeita a sua isotonia).

As verificações para determinar a integridade do complemento foram feitas pela aferição de sua capacidade hemolítica, isto é, pela propriedade de causar hemólise em um sistema hemolítico constituído de glóbulos de carneiro lavados e diluídos a 2,5% em água fisiológica, prèviamente sensibilizados por imune-sôro específico, diluído de forma

a ser obtida a concentração de 10 unidades hemolíticas por cada 1 ml de suspensão de glóbulos. A leitura dos resultados foi sempre feita após incubação em banho-maria a 37° durante 1 hora.

O aparelho de eletroforese empregado foi do tipo Tiselius, portátil, mod. 38, fabricado por PERKIN e ELMER, nos E. U. A.

Os sôros contendo complemento e as frações complementares foram estudados imediatamente após serem obtidos e sempre acompanhados de testemunhas. Foram êles diluídos em tampão de glicina, pH 8,3, fôrça iônica 0,2, na proporção de uma parte do material para 2 partes do tampão ou seja com uma diluição final de 1:3. Em seguida, a solução diluída foi dializada estaticamente contra um volume quarenta vêzes maior do tampão, durante quarenta horas no mínimo, através de membrana de papel celofane. Findo êste prazo, foi determinada a condutibilidade específica da solução a 0° C, que sòmente então, foi levada à cuba eletroforética. Empregamos as seguintes designações para identificar o material analisado:

- SL — A — Sôro normal de cobaio, contendo o complemento ativo.
- SL — B — O mesmo sôro anterior após ser inativado pelas radiações ultravioletas.
- SL — C — Fração albumina (C2), do complemento, obtida, pelo método de LIEFMANN.
- SL — D — Fração albumina (C2), idêntica à anterior, após ser inativada pelas radiações ultravioletas.

A fonte produtora de radiações ultravioletas utilizada, foi uma lâmpada "Hanovia", emitindo radiações na faixa de 2.482 Å a 3.130 Å, com o máximo de intensidade em 2.537. Å. Foi ela mantida a 10 centímetros de distância do material contido em pequena placa de Petri, com refrigeração assegurada de forma a manter a temperatura constante em + 10°C, oferecendo 3 centímetros de superfície, por 1 milímetro de espessura, sendo agitado de quando em vez durante todo o período da irradiação que foi de 20 minutos.

## RESULTADOS

A apreciação dos diagramas eletroforéticos dos materiais examinados, nos revelam a existência nos que foram submetidos às radiações ultravioleta, de nítidas alterações na zona correspondente aos componentes albumina e alfa-globulinas.

As alterações encontradas indicam-nos a presença de uma diminuição sensível na concentração da fração albumina e um acréscimo correspondente de material com propriedades eletroforéticas similares às das alfa-globulinas.

Considerando que tais resultados pudessem ser decorrentes de imperfeição do método empregado para separação das frações albumina e globulina, resolvemos repetir as mesmas experiências utilizando agora fração albumina pura comercial (fração V, Armour) cuja pureza já foi comprovada em nossos trabalhos de rotina em eletroforese. Submetida esta albumina ao tratamento pelas radiações ultravioleta, em condições idênticas às anteriormente usadas, verificamos pela análise eletroforética da mesma, *um decréscimo na quantidade de albumina e um acréscimo de concentração dos componentes proteicos da zona eletroforética das alfa-globulinas*, o que confirmou totalmente os resultados anteriormente obtidos.

Seguem-se os Quadros.

### QUADRO I

#### *Dados sobre a eletroforese*

AMOSTRAS	Material	Resist. a 0°C.	Tempo seg.	MOBILIDADES $\times 10^5$ cm/seg/volt/cm.	
				ALB.	$\alpha$
SL-A	Sôro cobaia	55,2	9 000	5,9	..
SL-B	SL-A irrad.	55,2	10 860	6,0	5,2
SL-C	Fração ALB.	56,5	6 180	5,8	4,6
SL-D	SL-C irrad:	57,0	7 440	5,6	4,5
ALB-A	Albumina, fr. V, Armour	55,2	3 600	6,0	..
ALB-B	Mesma irrad.	55,2	6.840	5,7	4,7

### QUADRO II

#### *Valores constantes*

Temperatura da electroforese 0-2°C.

Solução tampão: Glicina — NaOH/NaCl,  
pH = 8,3 ;  $\mu = 0,2$

Coefficiente da célula condut. = 0,5577

Fator de aumento da lente = 0,976

Fator de correção da mobilidade =  $+ 1,2 \times 10^5$

## QUADRO III

Áreas dos diagramas nas zonas ALB e  $\alpha$ 

AMOSTRAS	Áreas, mm <sup>2</sup> (*)		EFEITO IRRADIAÇÃO (**)	
	ALB	$\alpha$	ALB	$\alpha$
SL-A	12 125	1 000	92%	8%
SL-B	10 665	7 550	58%	32%
SL-C	5 675	4 290	63%	37%
SL-D	4 920	4 945	49%	51%
ALB-A	8 725	...	100%	...
ALB-B	8 660	9 425	48%	52%

\* Leituras feitas com ampliação de 10 x sobre o original, negativo.

\*\* Unidades percentuais arbitrárias, supondo presença apenas ALB e  $\alpha$  e a relação direta da concentração com as áreas dos diagramas.

## CONCLUSÕES

1 — Foi confirmada pela análise eletroforética do complemento de cobaio, inativado pelas radiações ultravioleta, que a fração sensível a essas radiações é a correspondente ao segundo componente (fração albumina, C2).

2 — A análise eletroforética das frações complementares submetidas às radiações ultravioleta apresentam um decréscimo na quantidade de albumina existente e um acréscimo correspondente da zona eletroforética das alfa-globulinas.

## SUMÁRIO

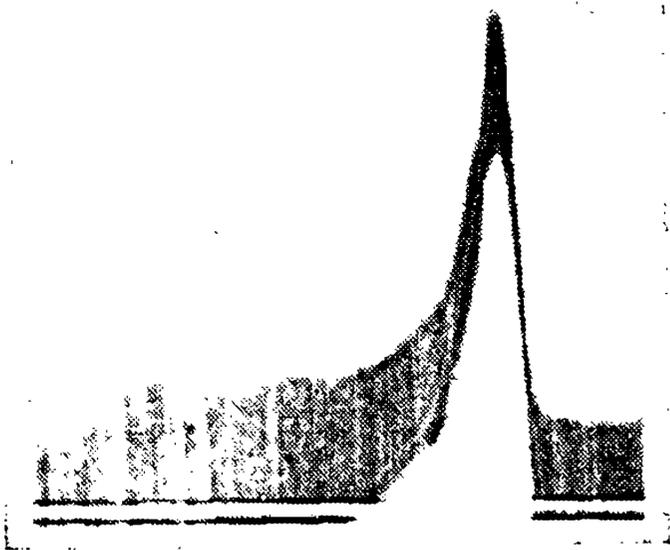
Foi realizada a análise eletroforética de sôros de cobaio, contendo complemento inativado pelas radiações ultravioleta, sendo verificada a existência de modificação na quantidade de albumina e um acréscimo correspondente da zona eletroforética das alfa-globulinas o que confirma a observação anterior de que a fração do complemento sensível às radiações ultravioleta, é o seu segundo componente (C2).

## SUMMARY

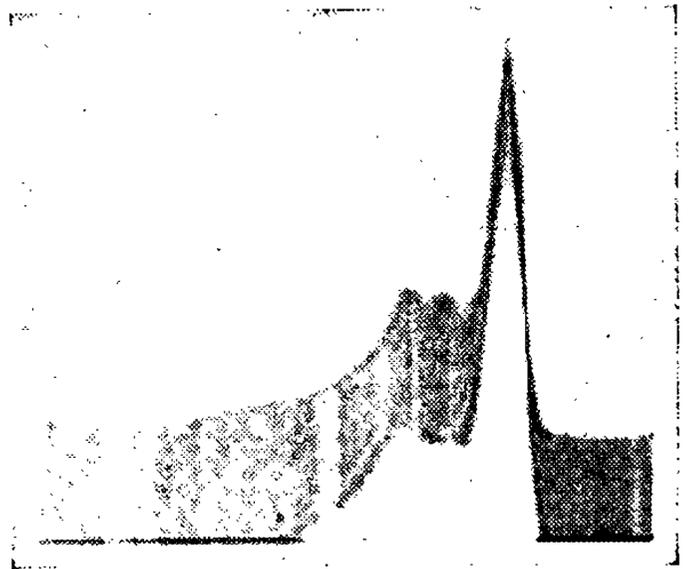
The electrophoretic analysis of sera from guinea pigs was made with complement inactivated by ultraviolet radiations.

It was found that the quantity of albumin changed, and an increase of the corresponding electrophoretic area of the globulins-alpha also took place, therefore, confirming the observations made previously that the fraction of the complement destroyed by ultraviolet radiations is its second component (albumin fraction, C2).

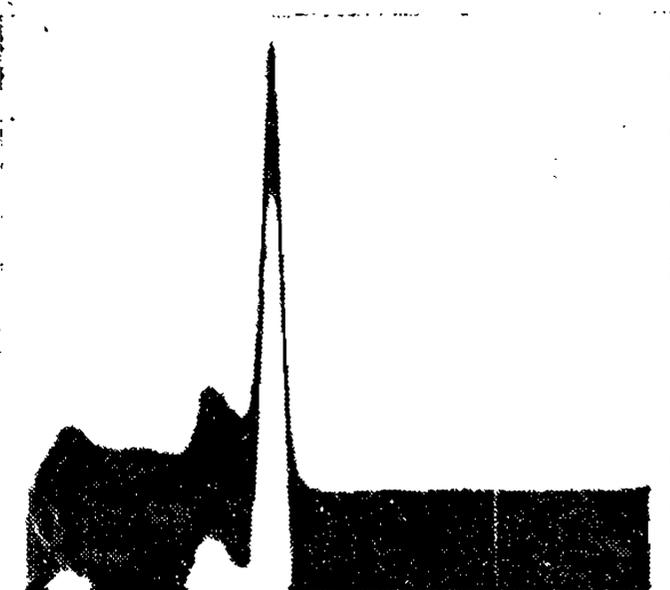
DIAGRAMAS OBTIDOS NO APARELHO DE TISELIUS COM AMOSTRAS DE COMPLEMENTO DE COBAIO E TESTEMUNHAS



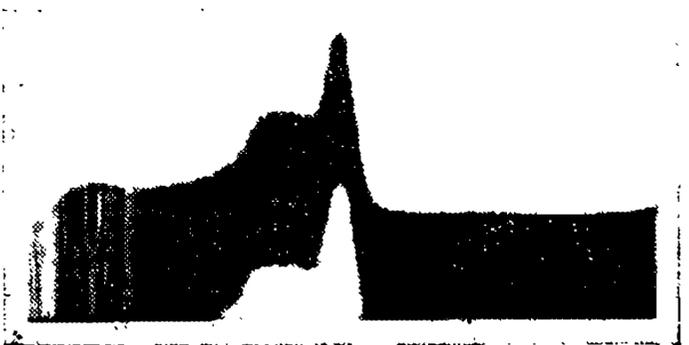
SL-A: Sôro normal, complemento aditivo. Ramo ascendente



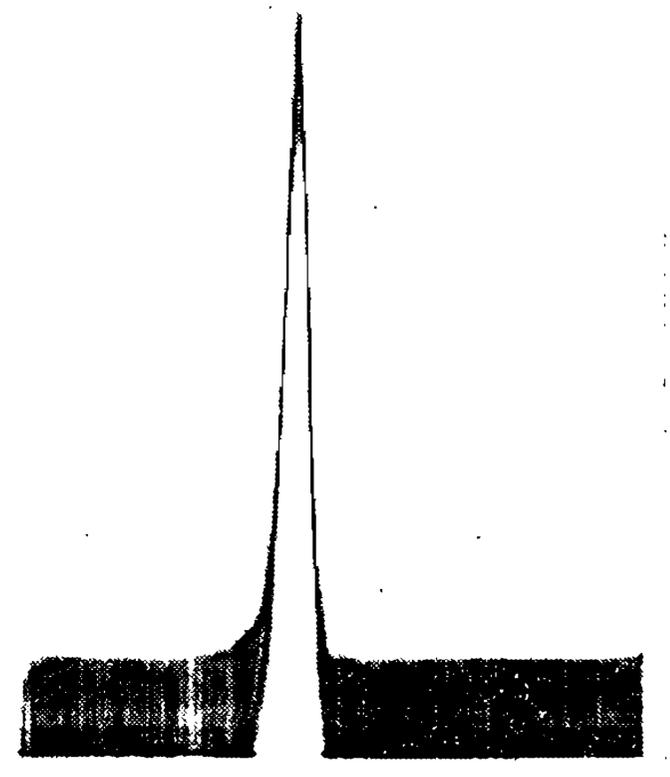
SL-B: Sôro normal, irradiado. Ramo ascendente



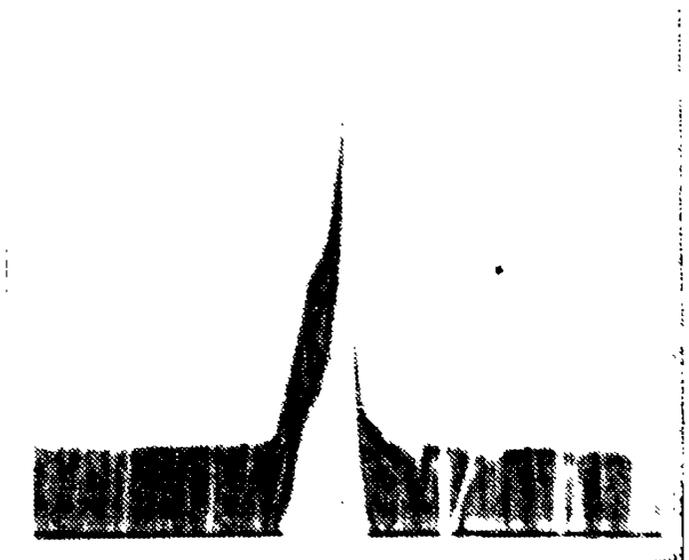
SL-C: Fração albumina (C<sub>2</sub>), seg. Liefmann. Ramo ascendente



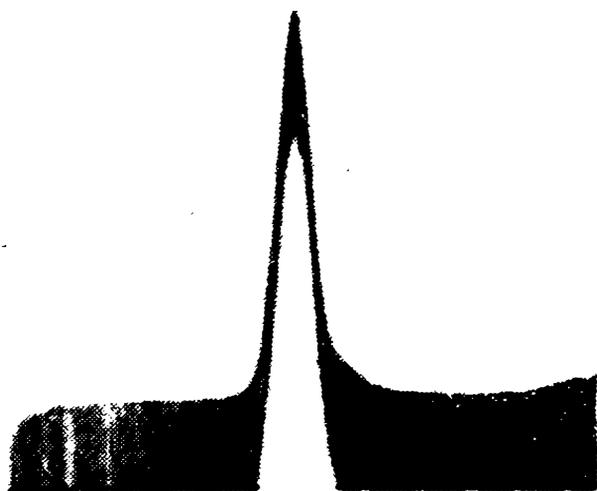
SL-D: Fração albumina (C<sub>2</sub>), seg. Liefmann, irradiada. Ramo ascendente.



ALB-A: Albumina Armour. Ramo ascendente.



ALB-B: Albumina Armour irradiada. Ramo ascendente.



ALB-A: Albumina Armour. Ramo descendente.



ALB-B: Albumina Armour irradiada. Ramo descendente.

---