

---

DEMONSTRAÇÃO DO COMPLEMENTO TOTAL  
NO LIQUIDO CEFALORRAQUEANO NORMAL

JOÃO BAPTISTA REIS-FILHO

Complemento ou alexina são as denominações dadas a uma substância do sangue que tem a propriedade de destruir células e bactérias sensibilizadas por um anticorpo específico. Entretanto, os fenômenos em relação com o complemento são tão diversos que é difícil formular uma definição concisa que inclua todas as suas atividades e manifestações. A dificuldade resulta naturalmente do fato do complemento não ser uma substância simples, mas uma série complexa de proteínas, algumas de natureza enzimática<sup>58</sup>. Como todas elas participam da citólise dependente do complemento, tornou-se habitual defini-lo tomando em consideração o seu poder de lesar membranas, conhecido por poder citolítico<sup>64</sup>. Os primeiros estudos analíticos sobre o complemento, feitos pelos autores antigos, permitiram considerá-lo constituído de dois componentes, o primeiro denominado "peça média ou fração globulínica", e o segundo denominado "peça final ou fração albumínica", ambos termos sensíveis. Posteriormente foi identificado o terceiro componente e finalmente o quarto componente, estes termoestáveis<sup>16,22,30,36,60,82,96</sup>.

O estudo eletroforético das proteínas constituintes do primeiro e do segundo componente<sup>71</sup> demonstrou que algumas expressões usadas eram incorretas, tendo sido proposta a abolição das designações "fração globulínica ou peça média" e "fração albumínica ou peça final" e aconselhada a uniformização da terminologia com os símbolos C' 1, C' 2, C' 3 e C' 4. Com o progresso dos conhecimentos, o complemento é atualmente considerado constituído por 9 componentes que se referem a onze proteínas<sup>3</sup>. Em 1968, o Comitê sobre Nomenclatura da Organização Mundial da Saúde recomendou uma modificação dos símbolos<sup>4</sup> designando o complemento total por C e os seus nove componentes por C1, C4, C2, C3, C5, C6, C7, C8 e C9, de acordo com a ordem de participação na reação imunológica. O componente C1 divide-se em três sub-unidades denominadas C1<sub>q</sub>, C1<sub>r</sub>, e C1<sub>s</sub>. O grupo dos últimos seis componentes (C3, C5, C7, C8 e C9) é também designado "conjunto C3" e, por esse motivo, com frequência, muitos autores ainda continuam a se referir aos "quatro componentes" para indicar, como anteriormente, o complemento total, particularmente nos estudos com dosa-

gens baseadas na reação de hemólise. Em 1938, Hegedüs e Greiner<sup>39</sup> descreveram o primeiro método de determinação quantitativa dos quatro componentes.

O sistema do complemento exerce uma função útil na resistência do hospedeiro a doenças infecciosas, constituindo importante fator de defesa. Além da citólise imunológica dos eritrócitos, das células nucleadas e das bactérias, o complemento participa de diversas outras atividades. Por motivo das numerosas ações biológicas exercidas pelo sistema do complemento, ele representa um fator importante na dinâmica da reação inflamatória. Entretanto, em determinadas situações, o complemento pode ser prejudicial ao organismo por sua participação no mecanismo autoimune, que determina sofrimento tecidual e consequente inflamação e doença<sup>43</sup>. Se o complemento é capaz de lesar "in vitro" membranas celulares de mamíferos, pode-se pressupor ocorrer "in vivo" circunstâncias nas quais o complemento tenha a possibilidade de atuar em membranas autógenas e, assim, determinar perturbação funcional. No decurso de uma doença do sistema nervoso de caráter imunológico, pode-se admitir que este mecanismo atue contra o tecido nervoso do próprio organismo e que o sistema do complemento seja envolvido no ciclo destrutivo como uma parte deste funcionamento orgânico paradoxal.

Devido às numerosas variáveis das diversas técnicas de dosagem do complemento, a possibilidade de confronto dos resultados dos diversos autores é apenas relativa<sup>84</sup>. Entretanto, desde que sejam observadas as instruções específicas de um método, os resultados podem ser comparáveis. Em geral, em pessoas sadias, o título do complemento do soro sanguíneo é constante, muito próximo da média da espécie<sup>27,29,89,97</sup>. No decurso de certas afecções verifica-se a variação da concentração do complemento no soro sanguíneo<sup>86</sup> e, em algumas delas, esta variação é dependente de fenômenos imunológicos simultâneos<sup>49</sup>. Estes fatos indicam o grande interesse do estudo, podendo-se antecipar o auxílio que a dosagem do complemento poderá trazer para o diagnóstico clínico. Numerosos autores demonstraram ou apreciaram o valor clínico da dosagem do complemento em certos processos mórbidos, particularmente em doenças que afetam o tecido conjuntivo<sup>2,18,19,33,83</sup>. A esquematização ideal de comportamento do complemento durante o decurso de uma doença infecciosa, descrita por Hadjopoulos e Burbank<sup>37</sup>, nem sempre é observada. Conquanto o título do complemento varie durante o decurso de uma doença infecciosa, a grandeza e a direção destas alterações não são sempre uniformes<sup>27,28</sup>. Alguns autores<sup>20,21,27,28,89,97</sup> concordam em que o título do complemento pode ter um valor prognóstico, particularmente quando igual ou muito próximo de zero (prognóstico mau) ou quando, inicialmente muito diminuído, se eleva ulteriormente (prognóstico favorável).

Foram feitas pesquisas<sup>9,28,53,65,70</sup> sobre o comportamento do complemento do soro sanguíneo em pacientes com doenças do sistema nervoso e estes estudos sugeriram a sua importância em clínica neurológica

*Complemento no líquido cefalorraqueano* — No ano de 1900 Lewandowsky<sup>55</sup> afirmou que o líquido cefalorraqueano (LCR) normal não contém alexina. Em 1909, Plaut<sup>73</sup> acrescentou que nem o complemento, nem o amboceptor normal

passam para o LCR em pacientes com paralisia geral. Os estudos de Daniełopolu (1911)<sup>23,24</sup> sugeriram a ausência do complemento no LCR. Ciuca (1911)<sup>15</sup> comprovou que o complemento está ausente tanto no LCR normal como no LCR alterado por diversas condições patológicas, incluindo a meningite tuberculosa.

Em 1911, Weil e Kafka<sup>94,95</sup> introduziram uma nova reação que enriqueceu a semiologia do LCR e despertou grande entusiasmo pelas suas possibilidades diagnósticas. Esta nova prova consistia na pesquisa do amboceptor para hemácias de carneiro, o qual em condições normais só existe no sangue, sendo a sua presença no LCR interpretada como indicadora de aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos das meninges. Esta reação permitia também a identificação do complemento e Weil e Kafka demonstraram-no presente em raros casos de demência paralítica, porém, de modo muito frequente em pacientes com meningite aguda. Em grande número de outras doenças os resultados foram negativos, salvo raras exceções. Esta reação constituiu motivo para pesquisas e os resultados dos diversos investigadores foram em geral concordes<sup>10,11,12,42,59,60</sup>.

Nos tempos anteriores ao advento dos antibióticos no tratamento das meningites, a questão da presença do complemento no LCR tinha grande importância prática por motivo da soroterapia específica constituir o único recurso terapêutico então existente. A ausência do complemento no LCR em muitos pacientes com meningites de diversas etiologias ou a sua pequena quantidade eram considerados parcialmente responsáveis pelo efeito insuficiente do antisoro específico, pois a administração associada de soro fresco (complemento) no espaço subaracnóideo proporcionava, por vezes, resultados terapêuticos muito bons ou mostrava ação definida sobre as bactérias. Nestes trabalhos em que este assunto foi discutido, com apreciações favoráveis<sup>14,25,47,62,81,92,93</sup> e com apreciações não favoráveis<sup>66,72</sup>, encontram-se referências<sup>14,47,62,92,93</sup> à ausência ou presença do complemento em quantidade mínima no LCR.

Kolmer e col.<sup>46</sup> demonstram o complemento em 13 pacientes dentre 43 com poliomielite em fase aguda da doença. Fothergill<sup>34</sup> fez importantes estudos sobre o complemento no LCR de pacientes com vários tipos de doenças inflamatórias do sistema nervoso central, verificando que ele estava presente com mais frequência em pacientes com meningite tuberculosa e meningite meningocócica do que em meningites de outras etiologias.

No ano de 1922, Banchieri<sup>7,8</sup>, Göckel<sup>35</sup> e Kafka<sup>43</sup> publicaram os primeiros estudos sobre componente do complemento no LCR demonstrando que, em condições normais, não há atividade hemolítica do complemento total, porém sempre está presente a fração então denominada "fração globulínica ou peça média". Em 1949, pela primeira vez, Spicer e col.<sup>88</sup> fizeram a pesquisa dos quatro componentes do complemento no LCR, demonstrando que sempre um ou mais de um componente podia ser evidenciado em pacientes com doenças inflamatórias do sistema nervoso central. Nos casos de meningite bacteriana, em geral, os quatro componentes estavam presentes, sendo os componentes C1 e C4 os que se apresentavam em maior concentração, seguindo-se depois o

componente C3 e, afinal, em menor concentração ou ausente, o componente C2. Nos casos de encefalite, encefalomielite e poliomielite, observaram a presença de C1 e C4 em todos os casos, porém C3 em um único caso e C2 ausente em todos. Depois destes trabalhos iniciais, numerosos outros autores investigaram o comportamento do complemento total e de seus componentes no LCR de pacientes neurológicos.

Reis e Bei<sup>77</sup>, em uma pesquisa do complemento total em 217 amostras de LCR, verificaram a sua ausência em 117 casos normais e a sua presença em 53 dentre 100 amostras de LCR alteradas por patologias diversas, tais como tumor intracraniano, processo compressivo raquiano, distúrbio circulatório cerebral agudo, meningite, encefalite, neurosífilis e neurocisticercose. Foi observada uma certa proporcionalidade entre o título do complemento total e a taxa das proteínas totais do LCR, sendo verificada em geral atividade hemolítica do complemento total nas amostras de LCR que continham taxa de 76 mg/100 ml ou mais. Porém, foram observadas numerosas exceções, tais como a presença de complemento em amostra de LCR com apenas 31 mg/100 ml e, de outro lado, ausência do complemento em amostra de LCR com a elevada taxa de proteínas de 192 mg/100 ml. Buchanan e Macnab<sup>13</sup> pesquisaram o complemento total no LCR em um grupo de pacientes, tendo observado ausência no grupo controle normal e em pacientes com encefalite, porém presença em aproximadamente 50% dos casos de pacientes com meningite purulenta criptogenética e meningite tuberculosa. Kuwert e col.<sup>51</sup> estudaram 53 amostras de LCR obtidas de pacientes com esclerose múltipla, dos quais 30 em fase aguda e 23 em fase crônica, e confrontaram os resultados com aqueles do grupo padrão normal. Eles verificaram que a atividade dos componentes do complemento era mais baixa do que nos casos normais e esta diferença foi assinalada principalmente no grupo de pacientes com esclerose múltipla em fase aguda. Estes resultados foram confirmados em trabalhos ulteriores<sup>6,53</sup>. Outros pesquisadores estudaram o comportamento de componentes do complemento em pacientes com esclerose múltipla<sup>26,31,57,68</sup>, com neurite óptica<sup>67</sup>, com lupus eritematoso disseminado e comprometimento neurológico<sup>38,54,70</sup> ou comprometimento psíquico<sup>5</sup>, e em pacientes com processos infecciosos do sistema nervoso<sup>41,85</sup>.

Heidelberger e Muller (1949)<sup>40</sup> fizeram um estudo baseado em 22 pacientes com diversas perturbações mórbidas, dos quais foram retiradas amostras de LCR antes da prova pneumoencefalográfica, sendo a taxa das proteínas em 16 casos inferior a 41 mg/100 ml e, em 6, compreendida entre 46 a 100 mg/100 ml. Os resultados apresentados por estes autores estavam em desacordo com aqueles dos pesquisadores que os precederam e também em desacordo com aqueles dos pesquisadores que divulgaram as suas experiências ulteriormente. Eles afirmaram ter observado a presença da atividade hemolítica do complemento total em cerca de um terço dos casos, em provas feitas diretamente com hemácias sensibilizadas. Tentando possivelmente oferecer maior apoio a estes resultados discordantes daqueles da literatura em geral, procuraram confirmá-los por meio de outro processo de investigação, um método indireto, com o qual verificaram intensificação da hemólise em 20 casos, que foi interpretada como devida à existência do complemento total no LCR.

Kuwert e col.<sup>50</sup> não observaram atividade do complemento total em qualquer das 163 amostras de LCR normal do grupo referência. Mesmo no LCR patológico, porém com taxa de proteínas inferior a 60 mg/100 ml, a atividade do complemento total estava ausente na maioria dos casos. Entretanto, eles demonstraram a presença dos quatro componentes em 34% dos casos de amostras de LCR normal. Bammer<sup>6</sup> fez pesquisa em 91 amostras de LCR normal e concluiu que em geral a atividade do complemento total está ausente, porém podiam ser encontrados os componentes C1 e C4 praticamente sempre e C2 e C3 em mais que 50% dos casos. Fiessinger e col.<sup>31</sup>, em trabalho baseado em material constituído de 32 pacientes, dos quais 5 foram considerados normais, obtiveram resultados semelhantes, concluindo que o complemento total não existe no LCR normal, somente sendo encontrado quando a taxa de proteínas do LCR for superior a 80 mg/100 ml. Entretanto, os quatro principais componentes podiam ser dosados no LCR normal ou patológico. Os componentes C1 e C4 foram os mais importantes; C3 e C2 estiveram presentes em menores proporções; o componente C2 foi o mais inconstante. Assim sendo, com exceção de Heidelberg e Muller<sup>40</sup>, cujos resultados e métodos serão discutidos ulteriormente, todos os demais pesquisadores são unânimes em afirmar que o LCR normal é desprovido da atividade hemolítica do complemento total.

O objetivo do presente trabalho é a demonstração da atividade hemolítica do complemento total no LCR normal do homem.

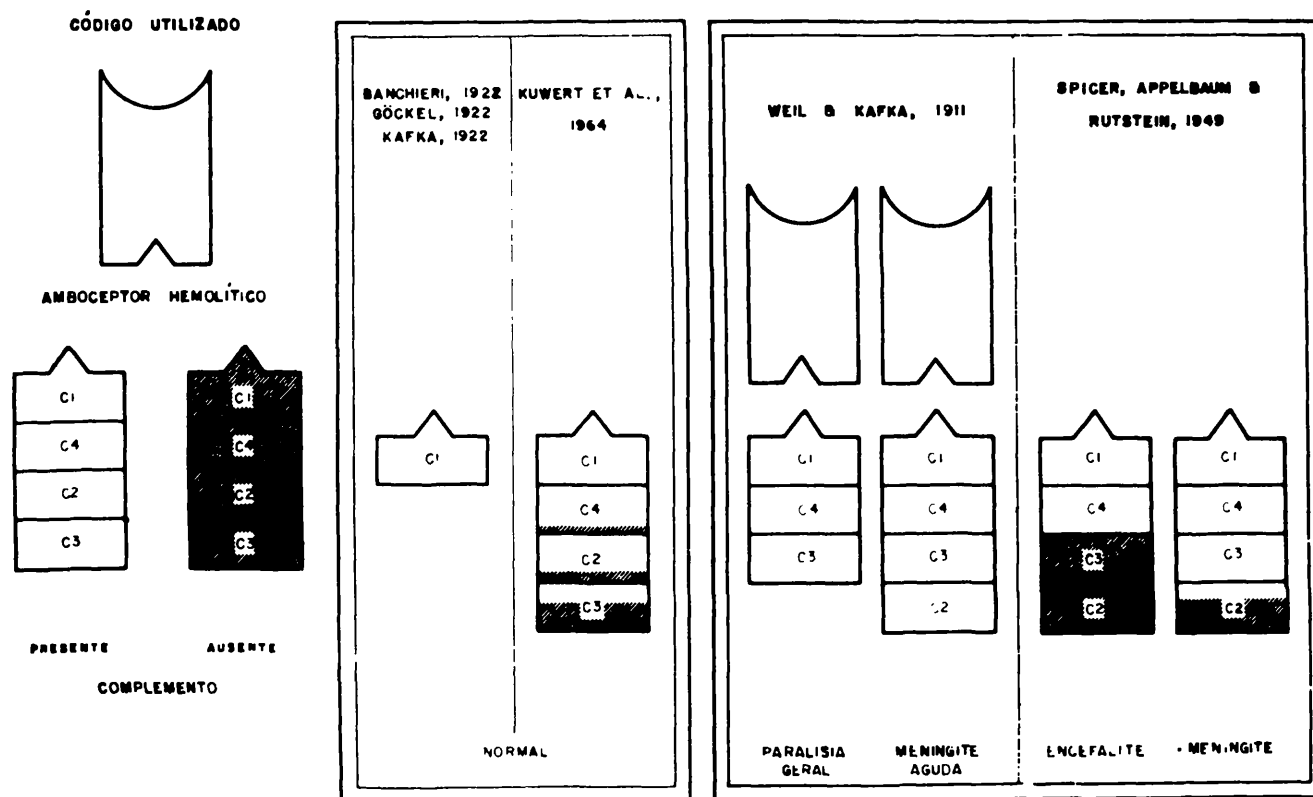


Fig. 1 — Desenvolvimento dos estudos sobre o complemento (modificação do esquema de Kafka, 1953).

MATERIAL E METODOS

**Experiências preliminares** — Kuwert e col.<sup>50</sup>, Bammer<sup>6</sup>, e Kuwert e col.<sup>53</sup> manifestaram certa estranheza diante da ausência de atividade hemolítica do complemento total no LCR normal, embora eles houvessem demonstrado a presença dos quatro com-

ponentes em muitos casos. Este fato pareceu-nos indicar que o LCR normal não possuía a atividade hemolítica do complemento total, provavelmente por motivo da concentração insuficiente das proteínas. Para investigar esta hipótese fizemos uma prova preliminar concentrando uma amostra de LCR normal e adicionando hemácias de carneiro sensibilizadas. Após a incubação em banho-maria 37°C. comprovamos atividade hemolítica. Para ter a segurança de que este efeito observado era realmente devido à atividade hemolítica do complemento total, repetimos esta prova em 10 amostras de LCR normal, dividindo desta vez o concentrado em duas partes, uma das quais foi inativada à temperatura de 56°C. durante 20 minutos. Verificamos que a hemólise só era observada com o LCR ativo. Destas observações preliminares surgiu o plano deste estudo.

*Experiências atuais* — O material utilizado para este trabalho foi obtido de pacientes atendidos em ambulatório, sem doença de ordem geral, porém com perturbações neurológicas ou psíquicas, que em geral não costumam determinar alterações do LCR; o exame do LCR foi feito com finalidades diagnósticas. Destes casos foram selecionados 108 com LCR normal, de acordo com o conceito estabelecido por Reis e col. 80. Neste material, 48 pacientes pertenciam ao sexo masculino e 60 ao feminino e as idades estavam compreendidas entre 10 e 60 anos. O LCR foi colhido por punção da cisterna magna, paciente deitado, sendo todas as amostras isentas de sangue. O exame de rotina consistiu na medida da pressão, observação do aspecto e cor, contagem global das células, determinação da taxa das proteínas totais pelo método turbidimétrico 56,75, reações de Pandy, Weichbrodt e Nonne, reação do benjoim coloidal, dosagem das substâncias redutoras 74, da taxa de cloretos 76 e reações de fixação de complemento para sífilis e cisticercose 77.

A técnica utilizada para a demonstração da atividade hemolítica do complemento total é constituída de duas fases, a primeira preparatória de concentração do LCR, a segunda representada pela dosagem propriamente dita. Depois de feita a leitura das reações, procede-se o cálculo do título. A concentração do LCR é obtida reduzindo-se o seu volume 20 vezes, pelo método da diálise sob pressão negativa de 400 mm Hg, de acordo com o processo de Mies 61, utilizando a camisa de colódio Schleicher & Schuell, imersa em solução salina de NaCl a 8,5 gr por litro, deixando-se o aparelho de concentração dentro da geladeira, em temperatura de 4°C., até que se processe a retirada da água e seus solutos. O sedimento assim obtido é redissolvido em solução salina. Os poros desta camisa de colódio impedem a passagem de moléculas protéicas até o peso de 70.000. Visto como o peso molecular das proteínas representantes dos diversos componentes do complemento 64 é sempre maior que 70.000, este processo de concentração é perfeitamente válido. Diante de certa divergência de opinião entre os investigadores 32,54,70 a respeito da temperatura ideal de conservação do LCR, na qual o título dos componentes do complemento se mantém estável, foi decidido concentrar o LCR imediatamente após a sua colheita, procedendo-se à dosagem logo após completada esta fase. O tempo que decorreu entre a punção cisternal para a colheita do LCR e a execução da reação de hemólise foi de 4 a 6 horas.

Utilizamos em nossas experiências 7 ml de LCR. A decisão de concentrar o LCR 20 vezes foi tomada de um modo relativamente empírico porque durante as experiências preliminares esta redução de volume nos pareceu permitir a realização de nosso propósito. Neste LCR concentrado 20 vezes foi feita a determinação da atividade hemolítica do complemento total, utilizando-se a técnica 90 baseada no ponto de referência de hemólise de 50%, com leitura fotométrica (colorímetro fotoelétrico Klett-Summerson), filtro verde. O método de dosagem do complemento está exemplificado no quadro 1.

A determinação do título foi feita pelo método gráfico, tal como descrito por Reis e Bei 77. Em 83 casos foram obtidos três pontos de leitura útil e o cálculo foi feito pelo processo habitual. Com base nestas dosagens, foi determinado o valor médio de h (inclinação da curva de hemólise segundo a fórmula de von Krogh 48) e, com auxílio deste parâmetro, foi calculado o título em 17 outros casos que somente apresentavam dois pontos de leitura útil. Em 6 casos não foi possível determinar o título por haver apenas um ponto de leitura utilizável.

	1	2	3	Test.
LCR concentrado 20 vezes (ml)	0,05	0,10	0,15	—
Solução salina NaCl 8,5 g/1000 (ml)	0,10	0,05	—	0,15
Hemácias sensibilizadas (ml)		0,10		
Banho-maria 37°C. 1/2 hora				
Adicionar a cada tubo 2,6 ml de solução salina à temperatura de 4°C., centrifugar durante 5 minutos e proceder à leitura fotométrica do líquido sobrenadante.				
Hemólise %	10	52	79	3

Quadro 1 — Exemplo de dosagem do complemento total

### RESULTADOS

A atividade hemolítica do complemento total foi verificada presente em 106 amostras de LCR normal, concentrado 20 vezes. Apenas em duas amostras a pesquisa do complemento total foi negativa.

Em 100 casos, o título do complemento total variou de 4 a 23 unidades de hemólise 50% em 1 ml de LCR concentrado.

A hemólise muito discreta observada em seis casos e a ausência de hemólise em dois outros, indicando deficiência de complemento para esta técnica de investigação, pode muito provavelmente ser atribuída à concentração insuficiente das proteínas do LCR. Uma segunda causa, menos provável, é a deficiência de complemento no soro sanguíneo, a qual pode ser observada mesmo em boas condições de saúde, como foi demonstrado por Silverstein<sup>87</sup> e outros<sup>1,17,45</sup>.

### DISCUSSÃO

Por motivo da participação do complemento na reação antígeno-anticorpo, o seu estudo representa valioso meio de pesquisa em patologia imunitária. Daqui decorre o interesse de sua investigação no LCR visando ao esclarecimento de certas afecções neurológicas. A importância do estudo do complemento no LCR foi salientada por Kafka<sup>44</sup>, que prenunciava um enriquecimento dos métodos de diagnóstico quando os conhecimentos fossem ampliados. Realmente, numerosas investigações sobre os componentes do complemento no LCR demonstram a importância deste estudo em Neurologia, particularmente na esclerose múltipla e no lupus eritematoso disseminado com sofrimento do sistema nervoso central. Estas pesquisas aumentaram consideravelmente os conhecimentos sobre este tema e deve-se esperar que a conjectura de Kafka<sup>44</sup> se torne realidade quando estudos futuros delinearem uma prova simples e de interesse prático em clínica neurológica.

Os resultados das nossas investigações mostram que o complemento total está presente no LCR normal, apenas não podendo ser evidenciado pelos métodos habituais por motivo da pequena concentração das proteínas.

O título do complemento total oscilou amplamente, não se observando correlação evidente com a taxa das proteínas totais, tal como assinalada na

literatura <sup>6,50,77</sup>. Em nosso estudo este fato não está manifesto claramente, provavelmente porque a faixa de variação da taxa de proteínas totais é muito estreita no LCR cisternal normal.

Até o presente momento, tanto quanto é de nosso conhecimento depois de revisão bibliográfica, esta técnica de investigação por nós executada e a demonstração da presença do complemento total no LCR normal não foram ainda feitas. De toda a literatura consultada, selecionamos quatro trabalhos cujos resultados merecem ser discutidos aqui.

Heidelberger e Muller<sup>10</sup>, em trabalho que apresentou resultados discordantes àqueles já verificados pelos demais pesquisadores, observaram a presença de atividade hemolítica do complemento total na grande maioria dos casos estudados, constituídos de amostras de LCR normal e de amostras de LCR alterado. Inicialmente foi feita a pesquisa por técnica direta. Porém, estes autores, considerando que as intensidades de hemólise foram muito fracas, o que significava que estas leituras de pouca intensidade se localizavam em um ponto pouco fiel da curva de hemólise<sup>48</sup>, resolveram repetir a investigação por meio de um processo indireto. Este processo consistia em adicionar a uma diluição de complemento de soro humano, cujo título fora previamente determinado, a amostra de LCR em estudo. Qualquer aumento do título do complemento nesta mistura foi considerado devido à adição de complemento procedente do LCR acrescentado. Hoje sabemos que esta interpretação não foi correta porque estes autores desconheciam que o LCR normal exerce um efeito ativante sobre o complemento, conforme foi posteriormente demonstrado<sup>77,78,79</sup>. Este efeito ativante sobre o complemento já havia sido assinalado em relação ao soro humano normal<sup>91</sup>.

Kuwert e col.<sup>50,52</sup> demonstraram no LCR normal a presença dos componentes do complemento, sendo C1 em todas as amostras, C4 em 97%, C2 em 88% e C3 em 34% dos casos. Os quatro componentes estavam presentes em 56 dentre 163 amostras de LCR pesquisadas e entretanto não foi possível demonstrar a atividade do complemento total. Este fato de difícil compreensão foi atribuído pelos autores a um defeito no sistema do complemento do LCR normal, falta de um ou mais fatores necessários à imunocitólise. Bammer<sup>6</sup>, diante deste mesmo enigma, sugeriu que faltaria ao LCR normal um sub-fator do componente C3. Fiessinger e col.<sup>81</sup> consideraram a concentração fraca do componente C2 como responsável e limitante da atividade do complemento total.

Diante dos resultados de nossas pesquisas, as afirmações de Kuwert e col.<sup>50</sup> e de Bammer<sup>6</sup> devem ser reconsideradas.

Os resultados das nossas investigações abrem novo campo para pesquisas. Com esta nova técnica de estudo que possibilita a determinação da concentração do complemento total também no LCR normal, novas idéias podem ser sugeridas para trabalhos, quer em fisiologia, quer em fisiopatologia do LCR.

#### CONCLUSÕES

1 — Quando concentrado vinte vezes, o líquido cefalorraqueano cisternal normal apresentou o complemento total em 98% dos casos.



2 — O título variou de 0 a 23 unidades de hemólise 50% em 1 ml de líquido concentrado.

3 — A afirmação de que o sistema do complemento do líquido cefalorraqueano normal é incompleto ou defeituoso deve ser reconsiderada.

4 — Os resultados destas investigações abrem novo campo para pesquisa.

#### RESUMO

Até o presente momento, todos os autores afirmam que o líquido cefalorraqueano (LCR) normal do homem não apresenta atividade hemolítica do complemento total. Alguns pesquisadores verificaram, entretanto, a presença de todos os quatro componentes em muitas amostras de LCR normal sem conseguir, porém, demonstrar a atividade hemolítica do complemento total. Este fato parecia indicar que o LCR normal era desprovido da atividade hemolítica do complemento total provavelmente por motivo da concentração insuficiente de suas proteínas. Para investigar esta hipótese foi feita uma prova preliminar, concentrando 10 amostras de LCR normal, dividindo-se o concentrado em duas partes, uma das quais foi inativada à temperatura de 56°C., durante 20 minutos. Esta prova revelou hemólise das hemácias sensibilizadas somente em relação com o LCR concentrado ativo. Em prosseguimento foram feitas pesquisas em 108 amostras de LCR normal obtidas por punção cisternal, selecionadas de pacientes sem doença de ordem geral, porém com perturbações neurológicas ou psíquicas que, em geral, não costumam determinar alterações do LCR. As amostras de LCR foram concentradas vinte vezes o seu volume, pelo método da diálise sob pressão negativa em camisa de colódio, segundo o processo de Mies. Esta pesquisa proporcionou resultados que permitiram concluir que o líquido cefalorraqueano normal concentrado apresenta atividade hemolítica do complemento total em 98% dos casos. O título do complemento total variou de 0 a 23 unidades de hemólise 50% em 1 ml de líquido concentrado.

#### SUMMARY

##### *Demonstration of total complement activity in normal cerebrospinal fluid.*

It has long been known that total complement activity is absent in normal cerebrospinal fluid (CSF). Lewandowsky (1900) was the first to call attention to the fact and this finding has been confirmed by other investigators. There is only the discrepant article of Heidelberger & Muller (1949) whose peculiar results may be questioned, because what they observed in their experiments was the activating effect of CSF over serum complement, never an increase of the amount of complement itself.

In 1922, Banchieri, Göckel and Kafka demonstrated that the first component of complement (mid-piece) is always present in normal CSF and the studies in this line of investigation have progressed and other complement components were shown to be present in it. Kuwert et al. (1964) have demonstrated the

presence of the first component in all CSF specimens, the fourth and the second in the majority of the specimens, and the third component in approximately 30 per cent of the cases. However, in spite of the presence of the four components in many CSF specimens, these authors were not able to demonstrate total complement activity in any case. This puzzling abnormality led Kuwert et al. to assume that normal CSF complement system is defective.

Considering this hard problem carefully, the idea occurred to us that the low protein content would account for absence of total complement activity in normal CSF. In order to investigate this hypothesis, tests for complement activity were performed in a series of 108 normal CSF specimens. These specimens were routinely examined for cell count, proteins, sugar and chloride contents, globulins tests, complement fixation tests for syphilis and cysticercosis and all specimens were within normal values. Specimens containing blood were discarded. All specimens were concentrated in order to get a 20 times enrichment of the CSF proteins, according to Mies method of dialysis in collodion bag under negative pressure of 400 mm Hg. The tests for complement activity were performed as soon as possible (usually within four hours) after the withdrawal of CSF from the patients. For the demonstration of total complement activity the quantitative method of Wadsworth et al. (1931), based on photometric determination of the 50 per cent hemolytic endpoint was used. The titer is indicated by number of complement units in 1 ml of concentrated CSF.

The results of this investigation have demonstrated total complement activity in 106 normal CSF specimens.

Up to now, to the best of our knowledge this technique of investigation and the demonstration of total complement activity in normal CSF have not been previously described in the literature.

The following conclusions can be drawn from this study: 1 — when concentrated 20 times, normal cisternal cerebrospinal fluid showed the presence of total complement activity in 98 per cent of the cases; 2 — the complement titer ranged from 0 to 23 units in 1 ml of the concentrated fluid; 3 — the statement that normal cerebrospinal fluid complement system is defective must be reconsidered; 4 — the results of this investigation open a new field of research in cerebrospinal fluid physiology and pathophysiology.

#### REFERENCIAS

1. ALPER, C. A.; PROPP, R. P.; KLEMPERER, M. R. & ROSEN, F. S. — Inherited deficiency of the third component of human complement (C'3). *J. clin. Invest.* 48:553, 1969.
2. ASHERSON, G. L. — Serum complement levels in systemic lupus erythematosus and other diseases. *Aust. Ann. Med.* 9:57, 1960.
3. AUDRAN, R. — Notions actuelles concernant le complément. *Rev. Europ. Étud. Clin. Biol.* 15:610, 1970.
4. AUSTEN, K. F.; BECKER, E. L.; BORSOS, T.; LACHMANN, P. J.; LEPOW, I. H.; MAYER, M. M.; MÜLLER-EBERHARD, H. J.; NELSON, R. R.; RAPP, H. J.; ROSEN, F. S. & TRNKA, Z. — Nomenclature of complement. *Immunochemistry* 7:111, 1970.

5. BAKER, M.; HADLER, N. M.; WHITAKER, J. N.; DUNNER, D. L.; GERWIN, R. D. & DECKER, J. L. — Psychopathology in systemic lupus erythematosus: Relation to clinical observations, corticosteroid administration, and cerebrospinal fluid C4. *Semin. Arthritis Rheum.* 3:111., 1973.
6. BAMMER, H. — Liquorkomplement und Multiple Sklerose. *Dtsch. Z. Nervenheilk.* 188:271, 1966.
7. BANCHIERI, E. — Complemento emolitico e suoi componenti nel liquido cefalo rachidiano umano normale e patologico. *Pathologica* 14:434, 1922.
8. BANCHIERI, E. — Ricerche sul complemento emolitico dell' uomo. *Pathologica* 15:219, 1923.
9. BAXTER, D. G. — Serum complement in multiple sclerosis. A report of a study in 47 cases. *Neurology (Minneapolis)* 13:869, 1963.
10. BOAS, H. & NEVE, G. — Untersuchungen über die Weil-Kafkasche Hämolyse-reaktion in der Spinalflüssigkeit. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 10:607, 1912.
11. BOAS, H. & NEVE, G. — Weitere Untersuchungen über die Weil-Kafkasche Hämolyse-reaktion in der Spinalflüssigkeit. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 15:528, 1913.
12. BOAS, H. & NEVE, G. — Untersuchungen über die Weil-Kafkasche Hämolyse-reaktion in der Spinalflüssigkeit, speziell bei sekundärer Syphilis und Tabes dorsalis. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 32:429, 1916.
13. BUCHANAN, N. & MACNAB, G. — Cerebrospinal fluid complement and immunoglobulins in meningitis and encephalitis. *S. Afr. med. J.* 46:1376, 1972.
14. BUNIM, J. J. & WIES, F. A. — The use of fresh human serum (complement) in meningococcus meningitis. *J. Amer. med. Ass.* 100:178, 1933.
15. CIUCA, M. — L'alexine et les anticorps de la circulation générale existent-ils dans le liquide céphalo-rachidien? *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 70:79, 1911.
16. COCA, A. F. — A study of the anticomplementary action of yeast, of certain bacteria and of cobra-venom. *Z. Immun. Forsch.* 21:604, 1914.
17. COOPER, N. R.; BENSEL, R. & KOHLER, P. F. — Studies of an additional kindred with hereditary deficiency of the second component of human complement (C2) and description of a new method for the quantitation of C2. *J. Immunol.* 101:1176, 1968.
18. COSSERMELLI, W.; FAVA NETTO, C.; KOPERSZTYCH, S. & CALICH, I. — Serum complement in systemic lupus erythematosus. *Rev. brasil. Pesquisas med. biol.* 3:85, 1970.
19. COSSERMELLI, W.; FAVA NETTO, C.; PAPALEO NETTO, M.; SERRO-AZUL, L. G. C. C.; DEBES, A. C. & GALLETA, V. P. — O complemento sérico na esclerose sistêmica progressiva e na polimiosite. *Rev. Ass. med. bras.* 20:290, 1974.
20. CRUZ, J. C. — Teneur du sérum en alexine dans la fièvre jaune. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 101:948, 1929.
21. CRUZ, J. C. — Diagnostic de la fièvre jaune par le dosage de l'alexine. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 101:954, 1929.
22. CRUZ, J. C. & PENNA, H. A. — Constituição da alexina e mecanismo da hemolyse específica. *Mem. Inst. Osw. Cruz* 26:99, 1932.
23. DANIELOPOLU, D. — Sur une substance hémolytique contenue dans le liquide céphalo-rachidien. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 69:259, 1911

24. DANIELOPOLU, D. — Sur une substance hémolytique contenue dans le liquide céphalo-rachidien humain. *Zbl. Bakt., I. Abt. Orig.* 56:143, 1911.
25. DAVIS, D. J. — Studies in meningococcus infections. *J. infect. Dis.* 2:602, 1905.
26. DUBE, V. E.; McDUFFIE, F. C.; BURTON, R. C. & ILSTRUP, D. — Cerebrospinal fluid complement in multiple sclerosis. *J. Lab. clin. Med.* 81:530, 1973.
27. ECKER, E. E.; SEIFTER, S. & DOZOIS, T. F. — Human complement. *J. Lab. clin. Med.* 30:39, 1945.
28. ECKER, E. E.; SEIFTER, S.; DOZOIS, T. F. & BARR, L. — Complement in infectious disease in man. *J. clin. Investig.* 25:800, 1946.
29. FAVA-NETTO, C.; MANISSADJIAN, A.; PENNA, H. A. O.; CORRADINI, H. B. & RUIZ JR., G. — O complemento do soro humano em indivíduos normais. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 8:37, 1966.
30. FERRATA, A. (1907) — Citado por Ritz, H.<sup>82</sup>.
31. FIESSINGER, J. N.; BRECY, H.; CASTAIGNE, P. & HARTMANN, L. — Étude du complément dans le L. C. R.: Résultats préliminaires. *Rev. Neurol. (Paris)* 128:117, 1973.
32. FIRNHABER, W. — Zum Nachweis von Komplement in menschlichen Liquor. *Z. Immun. — Forsch.* 126:145, 1964.
33. FISCHER, E. E.; PAULI, R. H. & LESH, J. — Serological studies in rheumatic fever: Serum complement in rheumatic state. *J. clin. Invest.* 28:1172, 1949.
34. FOTHERGILL, L. D. — Observations on the presence of complement in the cerebrospinal fluid in various pathologic conditions of the central nervous system. *J. Pediat.* 6:374, 1935.
35. GÖCKEL, M. — Beiträge zur Serologie des Liquor cerebrospinalis. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 79:303, 1922.
36. GORDON, J.; WHITEHEAD, H. R. & WORMALL, A. — The action of ammonia on complement: The fourth component. *Biochem. J.* 20:1028, 1926.
37. HADJOPOULOS, L. G. & BURBANK, R. — The role of complement in health and disease: A clinical study of the hemolytic complement of human sera. *J. Lab. clin. Med.* 14:131, 1928.
38. HADLER, N. M.; GERWIN, R. D.; FRANK, M. M.; WHITAKER, J. N.; BAKER, M. & DECKER, J. L. — The fourth component of complement in the cerebrospinal fluid in systemic lupus erythematosus. *Arthr. and Rheum.* 16:507, 1973.
39. HEGEDÜS, A. & GREINER, H. — Quantitative Bestimmung der Komplementbestandteile. *Z. Immun. — Forsch.* 92:1, 1938.
40. HEIDELBERGER, M. MULLER, R. H. — Complement and its components in human cerebrospinal fluid. *J. clin. Invest.* 28:282, 1949.
41. HOFFMAN, T. A. & EDWARDS, E. A. — Group-specific polysaccharide antigen and humoral antibody response in disease due to neisseria meningitides. *J. infect. Dis.* 126:636, 1972.
42. KAFKA, V. — Über die Bedingungen und die praktische und theoretische Bedeutung des Vorkommens hammelblutlösender Normallambozeptoren und des Komplements im Liquor cerebrospinalis. *Z. ges. Neurol. Psychiat.* 9:132, 1912.
43. KAFKA, V. — Über das Mittelstück-Phänomen der Lumbalflüssigkeit. *Klin. Wschr.* 1:2527, 1922.

44. KAFKA, V. — Liquor cerebrospinalis und Immunitätsforschung. Fortschr. Neurol. Psychiat. 21:311, 1953.
45. KLEMPERER, M. R.; WOODWORTH, H. C.; ROSEN, F. C. & AUSTEN, K. F. — Hereditary deficiency of the second component of complement (C'2) in man. J. clin. Invest. 45:880, 1966.
46. KOLMER, J. A.; FREESE, A. E.; MATSUNAMI, T. & MEINE, B. M. — Studies of the cerebrospinal fluid in acute anterior poliomyelitis. Amer. J. med. Sci. 154:720, 1917.
47. KOLMER, J. A.; TOYAMA, I. & MATSUNAMI, T. — The influence of active normal serum (complement) upon meningococci: The opsonic activity of fresh normal serum alone and in combination with antimeningitis serum for meningococci. J. Immunol. 3:157, 1918.
48. KROGH, M. von, — Colloidal chemistry and immunology. J. infect. Dis. 19:452, 1916.
49. KUWERT, E. — Das Verhalten des Komplementsystems im Verlaufe der experimentellen "allergischen" Enzephalomyelitis. Z. Immun. — Forsch. 126:137, 1964.
50. KUWERT, E.; FIRNHABER, W.; MAI, K. & PETTE, E. — Komplementsystem und Liquor cerebrospinalis: Methodik und Bezugswerte. Z. Immun.-Forsch. 127:321, 1964.
51. KUWERT, E.; PETTE, E.; FIRNHABER, W. & MAI, K. — Demonstration of complement in spinal fluid in multiple sclerosis. Ann. N. Y. Acad. Sci. 122:429, 1965.
52. KUWERT, E.; HOWER, J.; BALZERREIT, F. & PETTE, E. — Komplementsystem und Liquor cerebrospinalis: Ergebnisse vergleichender Titrationen mit Blut und Liquor. Z. Immun.-Forsch. 133:159, 1967.
53. KUWERT, E.; NOLL, K. & FIRNHABER, W. — Komplementsystem und Liquor cerebrospinalis: Das Verhalten von Gesamt-C' und C'1-C'4 in Serum und Liquor von Patienten mit Multipler Sklerose. Z. Immun.-Forsch. 135:462, 1968.
54. LAMPERT, P. W. & OLDSTONE, M. B. — Pathology of choroid plexus in spontaneous immune complex disease and chronic viral infections. Virchows Arch. Abt. A 363:21, 1974.
55. LEWANDOWSKY, M. — Zur Lehre von der Cerebrospinalflüssigkeit. Z. klin. Med. 40:480, 1900.
56. LIMA, A. T.; TANCREDI, F. & REIS, J. B. — O líquido cefalorraquidiano cisternal e lombar: Conceito de normalidade. Arq. Assist. Psicopatas (São Paulo) 5:391, 1940.
57. LINK, H. — Complement factors in multiple sclerosis. Acta neurol. scand. 48:521, 1972.
58. MAYER, M. M. — Mechanism of haemolysis by complement. In Wolstenholme, G. E. W. & Knight, J., pag. 4.
59. MELLO, H. — Das reações de Kafka em Neurologia. Tese, Faculdade de Medicina, Rio de Janeiro, 1914.
60. MERTENS, H. — Klinische und serologische Untersuchungen über die diagnostische Bedeutung der Weil-Kafkaschen Hämolyse-reaktion im Liquor cerebrospinalis. Dtsch. Z. Nervenheilk. 49:169, 1913.
61. MIES, H. J. — Einengung von Liquor cerebrospinalis als vorbereitung zur Papierelektrophorese: Ein einfaches und schonendes Verfahren. Klin. Wschr. 31:159, 1953.

62. M'KENZIE, I. & MARTIN, W. B. M. — Serum therapy in cerebrospinal fever. *J. Path. Bact.* 12:539, 1908.
63. MÜLLER-EBERHARD, H. J. & DALMASSO, A. P. — The possible role of complement in autoaggressive processes. *In* Wolstenholme, G. E. W. & Knight, J.º8, pag. 305.
64. MÜLLER-EBERHARD, H. J. — Complement. *Ann. Rev. Biochem.* 38:389, 1969.
65. NASTUK, W. L.; PLESCIA, O. J. & OSSERMANN, K. E. — Changes in serum complement activity in patients with myasthenia gravis. *Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.)* 105:177, 1960.
66. NEAL, J. B.; JAKSON, H. W. & APPELBAUM, E. — Meningitis due to the influenza bacillus of Pfeiffer (*Hemophilus influenzae*). *J. Amer. med. Ass.* 102: 513, 1934.
67. NIKOSKELAINEN, E.; IRJALA, K. & SALMI, T. T. — Cerebrospinal fluid findings in patients with optic neuritis. *Acta Ophthalm. (Kbh.)* 53:105, 1975.
68. OLSSON, J. E. & LINK, H. Immunoglobulin abnormalities in multiple sclerosis. Relation to clinical parameters: exacerbations and remissions. *Arch. Neurol. (Chicago)* 28:392, 1973.
69. OSBORN, T. W. B. — Complement or Alexin. Oxford Univeristy Press, London, 1937.
70. PETZ, L. D.; SHARP, G. C.; COOPER, N. R. & IRVIN, W. S. — Serum and cerebral spinal fluid complement and serum autoantibodies in systemic lupus erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 50:259, 1971.
71. PILLEMER, L. & ECKER, E. E. — The terminology of the components of complement. *Science* 94:437, 1941.
72. PITTMAN, M. — The action of type-specific hemophilus influenzae antiserum. *J. exp. Med.* 58:683, 1933.
73. PLAUT, F. & FISCHER, O — Die Lues-Paralyse Frage: Referat von Dr. Felix Plaut. *Allg. Z. Psychiat. psychisch-gerichtliche Medizin* 66:340, 1909.
74. REIS, J. B. & SCHMIDT, H. — Técnica fotométrica para a dosagem das substâncias redutoras no líquido cefalo-raquidiano pelo método de Folin-Wu. *Arq. Assist. Psicopatas (São Paulo)* 2:553, 1937.
75. REIS, J. B. — Determinação da taxa das proteínas totais, albumina e globulinas do líquido cefalo-raquidiano com o nefelômetro de Pulfrich. *Arq. Assist. Psicopatas (São Paulo)* 3:5, 1938.
76. REIS, J. B. & SCHMIDT, H. — Cloretos no líquido cefalo-raquidiano, *Arq. Assist. Psicopatas (São Paulo)* 4:337, 1939.
77. REIS, J. B. & BEI, A. — Reação de fixação de complemento para o diagnóstico sífilis e da cisticercose no líquido cefalorraqueano pela técnica de Wadsworth, Maltaner & Maltaner. *Rev. paul. Med.* 53:439, 1958.
78. REIS, J. B.; BEI, A. & REIS-FILHO, I. — O poder ativante do líquido cefalorraqueano sobre a alexina na reação de fixação de complemento: Influência do ion magnésio. *Rev. paul. Med.* 62:298, 1963.
79. REIS, J. B. & TRAVASSOS, F. M. — O poder ativante do líquido cefalorraqueano sobre o alexina na reação de fixação de complemento: Influência da concentração do CO<sub>2</sub> total do líquido. *Rev. paul. Med.* 62:304, 1963.

80. REIS, J. B.; BEI, A. & REIS-FILHO, J. B. — O Laboratório em Neurologia. Líquido cefalorraqueano. *In* Guimarães, J. X. & Guerra, C. C. C. (edit.): Clínica e Laboratório. Sarvier, São Paulo, 1976, pag. 345.
81. RITTENBERG, B. B. — Influenzal meningitis: report of a case with complete recovery. *J. Amer. med. Ass.* 102:1674, 1934.
82. RITS, H. — Ueber die Wirkung des Cobragiftes auf die Komplemente zugleich ein Beitrag zur Kenntniss der haemolytischen Komplemente. *Z. Immun. Forsch* 13:612, 1912.
83. RUDDY, S.; EVERSON, L. K.; SCHUR, P. H. & AUSTEN, K. F. — Hemolytic assay of the ninth complement component: Elevation and depletion in rheumatic diseases. *J. exp. Med.* 134:259, 1971.
84. SCHABINSKI, G. — Immunobiologische Eigenschaften des Liquors: Komplement und Komplementfaktoren im Liquor. *In* Schmidt, R. M. (edit) — *Der Liquor Cerebrospinalis. Volk und Gesundheit*, Berlin 1968, pag. 475.
85. SCHULLER, E.; ALLINQUANT, B.; GARCIA, M. & TOMPE, L. — Electro-immunodiffusion des protéines du liquide céphalo-rachidien. *Clin. chim. Acta* 33:5, 1971.
86. SCHUR, P. H. & AUSTEN, K. F. — Complement in human disease. *Ann. Rev. Med.* 19:1, 1968.
87. SILVERSTEIN, A. M. — Essential hypocomplementemia: report of a case. *Blood* 16:1338, 1960.
88. SPIGER, S.; APPELBAUM, E. & RUTSTEIN, D. D. — Complement and its component fractions in cerebrospinal fluid in inflammatory cerebrospinal diseases. *J. clin. Invest.* 28:389, 1949.
89. TOWES, A. S. — Topics in clinical medicine: complement levels in disease. *Johns Hopk. med. J.* 120:337, 1967.
90. WADSWORTH, A. B.; MALTANER, E. & MALTANER, F. — The quantitative determination of the fixation of complement by immune serum and antigen. *J. Immunol.* 21:313, 1931.
91. WALTON, S. T. — The role of serum globulins in the Wassermann reaction. *J. Lab. clin. Med.* 16:451, 1931.
92. WARD, H. K. & FOTHERGILL, L. D. — Influenzal meningitis treated with specific antiserum and complement. *Amer. J. Dis. Child.* 43:873, 1932.
93. WARD, H. K. & WRIGHT, J. — Studies on influenzal meningitis: The problem of specific therapy. *J. exp. Med.* 55:223, 1932.
94. WEIL, E. & KAFKA, V. — Ueber die Durchgängigkeit der Meningen besonders bei progressiven Paralyse. *Wien klin. Wschr.* 24:335, 1911.
95. WEIL, E. & KAFKA, V. — Weitere Untersuchungen über den Hämolysegehalt der Cerebrospinalflüssigkeit bei akuter Meningitis und progressiver Paralyse. *Med. Klin.* 7:1314, 1911.
96. WHITEHEAD, H. R., GORDON, J. & WORMALL, A. — The third component or heat-stable factor of complement. *Biochem. J.* 19:618, 1925.
97. WILLIAMS JR., R. C. & LAW, D. H. — Serum complement in connective tissue disorders. *J. Lab. clin. Med.* 52:273, 1958.
98. WOLSTENHOLME, G. E. W. & KNIGHT, J. (edit.) — *Ciba Foundation Symposium on Complement*. Churchill, London, 1965.