

O complemento em suas relações com a coagulação do sangue

„Bien que se prêtant particulièrement à l'analyse, puisqu'il s'accomplit *in vitro*, le phénomène de la coagulation n'a pas encore malgré les travaux innombrables dont il a été l'objet livré entièrement son secret.“

Bordet. ¹⁾

O maior segredo da coagulação do sangue está em se saber porque ele se conserva liquido, em condições normais intravasculares, e, porque, em condições anormais, ou fóra dos vasos sanguineos, coagula prontamente. Só uma explicação simples me parece caber no caso, é a da não existencia livre na circulação de um dos elementos necesarios á formação da fibrina, que, a meu ver, é o *complemento*.

Metchnikoff afirmou a *não existencia da alexina livre nos humores*; eu estou procurando mostrar, que quando ela se liberta em quantidade apreciavel, ou provoca fenomenos de coagulação, ou, como já foi lembrado em artigo anterior, é cauza da anafilaxia.

A baze principal da afirmação contraria está em que entre os plasmas e os sôros só se observam diferenças relativas, quanto ao teor de complemento (experienças de Gengou), e afirma-se que si Metchnikoff tivesse razão não se deveria encontrar no plasma nem vestílios de complemento, pois pelo uso de certos conservadores, os leucocitos não deveriam ter sido deteriorados e portanto fóra do que se considera como condição de libertação.

Vejamos o que nos ensina a esse respeito a coagulação do sangue, pois si pudermos demonstrar que o complemento é um dos elementos essenciais da coagulação, poderemos verificar mais comodamente as condições da sua libertação.

Verifiquemos em primeiro lugar quais os documentos que permitem a formação da hipótese sobre a analogia entre o complemento e a substancia coagulante termolabil.

* * *

„Le principe qui coagule le sang (fibrin-ferment ou trombine) exige aussi, pour apparaître, la presence de sels calciques

(Arthus et Pagés) il résulte de l'interréaction de deux substances méres (Morawitz), dont l'une le cytozime, de nature lipoidique, est voisine de la lécithine (Bordet et Delange); en milieu calcique, ces deux substances s'unissent. Comme l'hémolyse ou la bactériolyse, la coagulation dépend de la coopération de deux principes distincts. Mais là s'arrête l'analogie.“ ¹⁾

Ao contrario do que affirma Bordet não param aí as analogias, elas vão muitissimo adeante; bastaria lembrar por exemplo, além da ação favorecedora do calcio, o papel do citrato de sodio²⁾ e das outras substancias que tanto impedem a coagulação como a realização dos fenomenos de imunidade observados *in vitro*; os lipoides (Bail e Peterson e outros) e os sabões, atuando nos dois cazos no mesmo sentido, etc. Dentre as analogias mais importantes se destaca a do papel indiscutivel dos leucocitos quer na coagulação, quer na imunidade.

E não será, principalmente pelo choque que o leucocito irá libertar esse elemento essencial para o exercicio dos dois fenomenos? A melhor justificativa dessa hipótese está no proprio fenomeno de Pfeiffer. Metchnikoff refere que si se injectam grãos coloridos, no peritонеo de cobaias, esses mais tarde se encontram sobre o epiploon „no meio de filamentos de fibrina“ e refere ainda que a injeção de sôro fizioologico ou de caldo no peritонеo permite a verificação no epiploon de „massas fibrinosas“. Que vêm fazer esses filamentos de fibrina na cavidade, em que a libertação de complemento vai provocar a transformação em grânulos dos vibriões colericos?

Não é ainda uma analogia interessante o fato da coagulação exigir a cooperação de trez substancias, „a união de trez coloides em proporções variaveis“ (Nolf)? Esse fato não lembra principalmente as ideias de Bordet sobre a imunidade?

Quazi todas as teorias sobre a coagulação têm como baze comum essa afirma-

¹⁾ J. Bordet — *Traité de l'immunité* — p. 457.

²⁾ „Etant donné que des globules sensibilisés restent intacts dans un liquide contenant du citrate et de l'alexine...“ Bordet — op. cit. p. 420.

¹⁾ Considerations sur les theories de la coagulation du sang. — *Annales de l'Institut Pasteur* — 1920 — p. 561.

ção das trez substancias, embora esse fato fique de regra mais ou menos encoberto pela nomenclatura extraordinariamente rica e pela confusão quanto á orijem e á ligação dos dois elementos do complexo coagulante — a trombina. —

A teoria bazica da coagulação do sangue é a de A. Schmidt (1895), que pôde ser rezumida do modo seguinte:

a) No plasma existe em uma fôrma inativa um fermento, a que Schmidt chamou protrombina; b) segundo esse pesquisador a dezintegração dos leucocitos liberta uma outra substancia, que ajindo sobre a protrombina, converte-a em trombina ativa, esta unindo-se ao fibrinojenio fôrma a fibrina, é portanto um agente ativante. A esse agente ativante Schmidt deu o nome de substancia *zimoplastica*.

Penso que essa teoria deve ainda ser conservada e atualmente eu a enunciaria da seguinte fôrma:

a) No plasma existe livre uma substancia termostavel (até 68°) que por si só é incapaz de transformar o fibrinojenio em fibrina; b) uma leção dos leucocitos¹⁾ liberta uma outra substancia, termolabil (até 60°) capaz então de, com o auxilio da primeira, transformar o fibrinojenio em fibrina. A este agente coagulante pôde-se dar o nome de Complemento (Citaze ou Alexina).

Este enunciado obriga-me: 1.º a apresentar documentos de identidade entre o Complemento e a Substancia Zimoplastica de Schmidt, 2.º a mostrar que os sais de calcio só ajem como ionizadores que pôdem ser substituidos pelos de estroncio e não são, de um modo absoluto, indispensaveis ao fenomeno, 3.º a dizer que, quanto ás Plaquetas do sangue, acompanho mais ou menos as ideias de Schilling.

No decurso deste artigo cuidarei sómente da primeira dessas questões.

* * *

O fibrinojenio, que acredito corresponder na formação da fibrina ao antijenio, é um elemento que, segundo Hertzfeld e Klinger²⁾ representa o primeiro passo na dezintegração das proteínas dos tecidos, visto que se encontra em abundancia nos tecidos lezados ou fatigados.

Não cabe aqui o estudo minuciozo desse elemento primordial da coagulação, nem o da *protrombina* de Schmidt, pois não apresentam interesse especial a ser discutido aqui, a não ser a função de amboceptor e a de antijenio que discutirei em seguida, passo por isso a procurar demonstrar primeiramente a identidade do complemento e da substancia coagulante termolabil.

O quadro seguinte dá ideia clara do que vai ser discutido:

Complemento — W	{	<i>Trombozima</i> , Substancia termolabil (56—60°), encontra-se no sooro fresco, nos extratos frescos de loucocitos e de órgãos, falta nos extratos de espermatozoides, no soro e nos extratos envelhecidos, podendo entretanto neste cazo ser reativado. <i>E' soluvel na agua distilada</i> , etc.
Amboceptor — Y	{	<i>Trombojenio</i> (Fibringlobulina de Hammarsten) Substancia termostavel sómente até 65°; a 75° pode ficar completamente inativada; encontra-se nos soros velhos. <i>Insoluvel na agua distilada</i> , é precipitada completamente pelas soluções a pouco mais de meia saturação de Na ² So ⁴ , etc.
Antijenio — V	{	Essa substancia está de mistura, na maioria das soluções de fibrinojenio consideradas puras, com um ou dois dos elementos anteriores. Precipita-se pelo aquecimento a 55—56°, é tambem precipitada pela agua distilada, alcool, eter e sais precipitantes da primeira porção globulinica dos plasmas, entre outros pelo <i>Clorureto de sodio</i> .

¹⁾ Seria melhor dizer Fagocitos, porque assim ficariam considerados endotelios dos vasos, as células conjuntivas, etc.

²⁾ Biochem. Zeit. 1917 (83) Frisch e Starlinger, Zeit. ges. exp. Med. 1921 (24) 142.

Complemento	— W	{	Trombina, trombase, fibrinfermento, protrombina (pro parte) ¹⁾ . Encontra-se nos sôros e nos extratos frescos de órgãos ²⁾ , fica inativado nos sôros velhos e diz-se que a trombina passou a metatrombina, que é capaz de ser reativada pelas soluções fracas de alcalis.
Amboceptor	— Y		
Complemento	— W	{	Fibrina, Complexo insolúvel, resultante da reunião dos trez coloides, solúveis, quando em condições favoráveis de <i>ionização</i> .
Amboceptor	— Y		
Antígeno	— V		

Nota: Os globulos lavados de carneiro serão representados por V.

* * *

a) Libertação da substancia termolabil. A substancia zimoplastica não existe livre na circulação; fato esse exatamente comparavel ao que Metchnikoff afirmou para o complemento e que, em artigo anterior, procurei demonstrar de modo seguro, fixando o sangue ao sair dos vasos.

Para se verificar esse fato, basta que se repitam tais experiencias, fixando-se o sangue em tempos diferentes, a saber: I) logo ao sair da veia e II) depois de passados alguns minutos *in vitro*. O fixador

deve ser de ação rapida e não atacar violentamente a alexina.

Ajindo-se com presteza, a primeira porção não coagula e as ultimas o fazem em tempos cada vez mais curtos (até um certo limite) proporcionais á demora na fixação. Como a porção necessaria de fixador varia conforme o animal e, ás vezes, para o mesmo animal em dias diferentes, é conveniente estabelecerem-se pelo menos trez misturas de quotas diferentes de sangue e fixador.

Por exemplo:

10/XI/1926 — Sangue de cavalo. Fixador: Sol. fiz. 100, Sublim. 0,5, Formel 0,10.

		Coagulação
15 cc. de fixador e 10 cc. de sangue	1 Fixação imediata	+
	2 „ 2,5 m. depois	+
	3 „ 5 m. „	+
16 cc. „ „ „ „ „ „	4 „ imediata	—
	5 „ 2,5 m. depois	+
	6 „ 5 m. „	+
17 cc. „ „ „ „ „ „	7 „ imediata	—
	8 „ 2,5 m. depois	—
	9 „ 5 m. „	+

Nesse exemplo a mistura otima foi a de 16 de fixador para 10 de sangue, mas a fixação não é bastante rapida de sorte que, por outros meios podemos ver que a quota de complemento é menor nos tubos fixados cedo, mas não houve fixação suficientemente rapida para impedir toda a liberdade do complemento; ele está ainda prezente embora em quota minima.

O Dr. Pinheiro Chagas lembrou a fixação pelo acido osmico e procurou fixar

o sangue em tempos diversos, fazendo borbular nele vapores desse fixador. O metodo, embora confirmador em suas linhas gerais, não tem a precisão desejada, pois é difficil dozar-se exatamente a quota de gaz necessaria; mas a ideia do emprego do acido osmico é felicissima e tomando-se 90 cc. da solução de sublimado a 0,4% e acrescentando-se 10 cc. de sol. a 1% de acido osmico (tudo em sol. fisiologica), obtem-se otimo fixador para o cazo em questão.

¹⁾ „Mélange de trombozyme et thrombogène.“ — Nolf.

²⁾ Le suc des tissus doit une partie de son pouvoir coagulant ou cytosyme lipoidique qu'il contient, mais intervient aussi, nous l'avons rappele, grace a un constituant plus alterable, sensible notablement a la chaleur...“ Bordet.

		Coagulação
11 cc. de fixador e 5 cc. de sangue	1 Fixação imediata	+
	2 " 2,5 m. depois	+
	3 " 5 m. "	+
12 cc. " " " " " "	4 " imediata	—
	5 " 2,5 m. depois	+
	6 " 5 m. "	+
13 cc. " " " " " "	7 " imediata	—
	8 " 2,5 m. depois	—
	9 " 5 m. "	+

Como se vê desse quadro, a dóze de fixador foi absolutamente fraca no primeiro lote, e exatamente util no 2.º No 3.º já o excesso de fixador começa a prejudicar o fenomeno de coagulação.

* * *

b) **O esgotamento do complemento e a coagulação.** Para mostrar que a substancia termolabil aje como o complemento e não póde ser separado dele, basta tomar-se como antígeno (V), um fibrinojenio puro¹⁾, como amboceptores (Y), sôro normal e sôro hemolítico aquecidos a 58°—60°, serve de alexina (M), sôro fresco de cobaia

diluido como para reacção de Wassermann.

Si juntarmos os trez elementos, (V Y M) sendo o sôro inativado normal (Y), teremos coagulação, ainda que em presença de globulos de carneiro lavados (U Y).
M
V

Deixaremos entretanto de obter coagulação si misturarmos primeiramente o sôro fresco (M) com globulos de carneiro (U) e sôro especifico aquecido (Y) porque quando 1 h. depois juntarmos o fibrinojenio (V), o complemento já estará esgotado pelo complexo hemolitico (Y Y).
M
U V

¹⁾ Tecnica uzada para preparação do fibrinojenio: receber sangue de cavalo em 50% de fosfato de sodio coloidal humido e no fim de 15 minutos centrifugar e filtrar em papel de filtro: com o liquido assim privado de trombina, prepara-se o fibrinojenio pelo processo classico, isto é: precipita-se o fibrinojenio pela sol. sat. NaCl. Dissolve-se em agua distilada (volume igual ao do liquido que serviu para a extração), filtra-se em papel e precipita-se de novo e redissolve-se em agua distilada (metade do volume primitivo).

O Dr. Baeta Vianna, a quem devo minucias de tecnica, prepara o fosfato coloidal juntando á sol. sat. de clorureto de calcio a quota necessaria de sol. a 10% de fosfato de sodio, para a precipitação mais ou menos completa. Seguem-se varias lavajens com agua.

Isto quer dizer que com o esgotamento da alexina esgotamos tambem a substancia zimoplastica, ou melhor que as duas substancias são identicas, pois, como continuaremos a ver, não ha possibilidade de se encontrar um processo de separal-as, ou um caracter que possa distinguil-as.

Exemplo: Dia 5 de Novembro de 1926.

A verificação foi feita com globulos de carneiro á 5% e complemento de cobaia á 1/10, uzando-se 1 cc. de cada elemento e completando-se o volume de 4 cc. em cada tubo, com agua fizioologica á 0,85%.

		Coagulação
a) —	Globulos de carneiro a 5%	1 cc.
	Sôro inativado a 60°	1 cc.
	Complemento de cobaia 1/10	1 cc.
b) —	Fibrinojenio	1 cc.
		+
a) —	Globulos de carneiro a 5%	1 cc.
	Sôro hemolitico	1 cc.
	Complemento de cobaia 1/10	1 cc.
b) —	Fibrinojenio	1 cc.
		—

Póde-se variar ao infinito esta ultima prova, por ex: Toma-se: 1.º de um lado um sôro fresco e sôro antibacteriano (contra o bacilo tifico, por ex.) e fórma-se o complexo bacteria sôro especifico complemento, 2.º de outro lado um sôro não especifico aquecido o mesmo bacilo sôro fresco. Juntando-se fibrinojenio aos dois complexos verifica-se que o 1.º (complemento esgotado) não coagula e o 2.º coagula.

Ha porem um genero de prova que é bem mais interessante, porque vai bater fundo em um dos dogmas da imunidade, é o seguinte: Toma-se um sôro antitoxico (anti-ofidico ou antitetanico, e provavelmente os outros, mas não o verifiquei ainda) e fórma-se o complexo *veneno* (toxina) sôro *especifico* inativado sôro fresco e de outro lado: *veneno* sôro *normal* sôro *fresco*.

Depois junta-se aos dois o fibrinojenio e verifica-se o seguinte fato interessante é que a antitoxina ajiu como amboceptor e provocou o esgotamento da alexina, pois não só suprimiu a possibilidade de coagulação como a da hemolize o que entretanto não se deu nos tubos testemunhas. — Si se trabalhar com dózes elevadas de toxina, essas pôdem impedir a coagulação nas duas provas. (Experiencias de O. M. Lisboa).

* * *

c) Separação dos componentes da fibrina. A principio pareceu-me que dissolvendo a fibrina, poderíamos izolar os seus elementos componentes e assim estudal-os isoladamente. As primeiras experiencias mostraram-me porem, que isso não era possivel: não se consegue mais precipitar fibrinojenio em soluções de fibrina.

Isso aliaz não é de extranhar, pois a ação do complemento sobre o amboceptor antijenio deve ser de modificação completa deste, como se verifica com o complexo: *veneno* antiveneno ou antitoxina toxina, desde que se lhes junte complemento. E' o cazo da experiencia de Calmette e Massol (1907) quando se acrecentam provas com alexina, pois neste ultimo cazo o alcool não rejenera mais o veneno.

Henri de Waele procurou recoagular o liquido que rezulta da fibrinolize natural do coalho. „Nous n'avons pu, ni par légère alcalinisation, ni par légère acidification, refaire la coagulation: il semble

donc s'être établi la plutôt une modification de la structure moléculaire.

D'ailleurs, si on dialyse ce liquide fibrinolysé et qu'on le reprécipite par NaCl concentré, on reprécipite du fibrinogène, mais en quantité infiniment moindre, c'est-à-dire qu'une partie du fibrinogène s'est hydrolysée. “Esse infinitamente menos pôde ser devido a que a reação quimica seja como o querem Arrhenius-Madsen, comparavel ás ligações de acidos fracos com bases fracas.

Com a tecnica sugerida pelo Dr. Baeta Vianna não me foi difficil obter fibrinojenio puro, isto é, *que só coagula pela adição de sôro ativo*²⁾.

Não é tambem difficil preparar-se sôro inativado entre 58º e 60º, incapaz portanto de coagular o nosso fibrinojenio; a preparação de complemento puro exijiu porem, cuidados muito maiores e por isso só agora me foi possivel pensar na publicação definitiva deste trabalho.

O processo teve duas fazes:

I — Izolamento da Trombina (complemento e amboceptor).

Toma-se uma determinada quota de sôro fresco e junta-se-lhes 25% de fosfato de calcio coloidal humido (ou hidroxido de aluminio, de ferro, etc.) e depois de algum tempo centrifuga-se (póde-se fazer o mesmo com plasma salgado a 5% juntando-se logo depois partes iguais de agua distilada). Dilue-se o depozito em $\frac{2}{3}$ do sol. n/10 de NaOH. No fim de 10 minutos centrifuga-se. A trombina fica no liquido que, depois de neutralizado (pH 7,5) pôde servir para a prova de coagulação de fibrinojenio puro. A agua distilada, tambem permite a dezagregação da trombina.

II — Extração da Alexina.

Em vista da facilidade na adsorção da trombina e da possibilidade de subsequente libertação pela agua distilada, rezolvi experimentar varios adsorventes insolueis e juntar quota de agua distilada suficiente para precipitações das globulinas. O polvilho de engomadeiras depois de lavado alternadamente em agua acidulada pelo acido cloridrico e em agua alcalinizado pela soda caustica e preferivel para

¹⁾ Annales de Physiologie — T. III — p. 94 — 1927.

²⁾ O fibrinojenio preparado por Henri de Waele, izoeletrico, não é puro; a dialize não o livra das globulinas e ainda deixa vestijios de complemento.

a libertação, talvez por ter poder adsorvente menos energico do que o fosfato.

Para se fazer a extração do complemento pela agua distilada, junta-se ao sôro fresco a metade ou um terço de amido lavado¹⁾ e, no fim de $\frac{1}{4}$ de hora centrifuga-se o mais perfeitamente possível. Dilue-se o depozito, depois de bem escorrido o liquido, em quotas diferentes de agua distilada (de regra 50 H₂O para 1 de sôro), afim de se conhecer qual a quota que precipitando as globulinas não permitem mais que o liquido coagule o fibrinojenio sem adição de sôro inativado. Deve-se deixar agir a agua distilada pelo espaço de 2 a 3 h. ou mesmo mais e, depois disso, centrifuga-se energeticamente. No liquido encontra-se o complemento praticamente puro, isto é, livre dos outros elementos da coagulação.

Nas provas de coagulação procuro trabalhar com liquido em que o pH corresponda aproximadamente a 7,5. Fuji propositalmente de empregar a dialize como o fazem Bordet e outros, e alem disso evitei a filtração, pois o papel de filtro tem grande função adsorvente.

Em lugar de sôro inativado a 60°, podemos dissolver em solução fisiologica o precipitado de globulinas, obtido pela adição de sulfatos, depois de bem enxuto em papel de filtro.

Com tais soluções, praticamente puras, podemos realizar o fenomeno da coagulação, mas sómente quando reunirmos as trez substancias. E' preciso lembrar porem, que a quota de alexina conseguida é bastante fraca.

Com a solução de complemento em agua distilada e com sôro hemolitico do comercio ou com o de cavallo preparado contra os globulos de carneiro, fizemos repetidamente a seguinte prova, que me parece *crucial*:

Gl. sensibil. carneiro ...	1 got.	{	—
Sol. fisiologica	2 cc.		
Gl. sensibil. carneiro ...	1 got.	{	++
.....			
.....			
Sol. complemento cabaia	2 cc.		
Gl. carneiro lavados ...	1 got.	{	—
.....			
Sol. complemento cabaia	2 cc.		

¹⁾ Hidroxido de ferro precipitado — Precipita-se um sal ferriço por hidrato de amonio a saturação, lava-se até o desaparecimento do cheiro amoniacal.

Gl. sensibil. carneiro ...	1 got.	{	++
Sôro fresco cabaia a 1%	2 cc.		
Fibrinojenio puro	1 cc.	{	—
Sol. fisiologica	0,9		
Sol. clor. calcio	1 got.		
Sôro inativado a 60° ...	0,1		
Fibrinojenio puro	1 cc.	{	+
Sol. clor. calcio	1 got.		
Sôro inativado a 60° ...	0,1		
Sol. de complemento ...	0,9		
Fibrinojenio puro	1 cc.	{	—
Sol. fisiologica	0,1		
Sol. clor. calcio	1 got.		
Sol. de complemento ...	0,9		
Fibrinojenio puro	1 cc.	{	++
Sol. clor. calcio	1 got.		
Sôro fresco a 1%	1 cc.		

Como se vê desse quadro a substancia soluvel que coagula tambem hemoliza. A hipoteze de que fossem duas substancias, diferentes sómente quanto á função, não cabe em vista das provas anteriores de fixação do Complemento.

Póde-se obter uma solução de complemento por processo mais comodo, mas não expurgada de outros elementos do sôro, basta juntar-lhe diretamente 50 vezes o volume de agua distilada. Si applicarmos diretamente este ultimo processo ao sangue, veremos, nas provas hemoliticas, o seguinte fato interessante é que: *a par da hemolize* (em tubo: Globulos sôro hemolitico e a solução em que ficou o complemento) *haverá tambem coagulação*. O resultado não é de se extranhar, pois a agua distilada conservou o Fibrinojenio ao lado do Complemento, e a junção do fator intermediario — sôro — vem permitir a formação do coagulo.

Conclusões:

Ao terminar penso poder concluir que:
a) Uma das funções fisiologicas do Clomplemento é a da Coagulação.

b) Essa substancia não existe livre no sangue circulante e quando em condições anormais, ela se liberta no organismo, forma trombos ou, como vimos em artigo anterior, si a coagulação foi apenas esboçada (Doerr), provoca: *o choque anafilatico*.

H. Marques Lisboa.