

MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXVI

Agosto — 1932

Fasciculo 2

Acção do formol sobre a alexina de cobaya (*)

pelos

DRS. J. DA COSTA CRUZ e H. DE AZEVEDO PENNA

Com os methodos actuaes de technica póde-se demonstrar que a acitividade alexica dos sôros frescos de cobaya é o resultado da acção simultanea ou successiva de quatro factores que nesses sôros se encontram presentes. Dois delles são termolabeis e pódem-se isolar pelos methodos que permittem separar as globulinas das albuminas: dialyse (Ferrata 1907), acção de acidos diluidos (Sachs e Altmann 1909), agua distilada saturada de gaz carbonico (Liefmann 1909) ou precipitação pelo sulfato de ammonio (Browning e Mackie 1914); os outros dois, termo-resistentes, encontram-se ainda activos nos sôros submettidos a aquecimento, a 54° ou 56° por espaço de meia hora, e separam-se um do outro porque o terceiro se póde retirar desses sôros pelo contacto prolongado com emulsões de levedos (Coca 1914), sem todavia destruir o quarto que por sua vez pequenas quantidades de ammonia retiram sem alterar o terceiro (Gordon, Whitehead e Wormall 1926). Com o intuito de verificar se a complexidade da alexina não é ainda maior do que os dados experimentaes até agora estabeleceram, procurámos estudar a acção, que por ventura exerce o formaldehido sobre a alexina de cobaya, e são os resultados encontrados que constituem o objecto do presente trabalho.

Logo de inicio observámos que em forte concentração no sôro fresco de cobaya, isto é a 10 % ou a 1 %, o formol inactiva tanto as fracções termo-labeis como as termo-resistentes da alexina mesmo após um con-

(*) Apresentado ao Congresso Internacional de Biologia realizado em Montevideo, Outubro 1930.

tacto de apenas 5 minutos, a 37°C. Neste praso e nesta ultima concentraçãõ, entretanto, a addiçãõ de sôro inactivado pela ammonia pôde ainda determinar hemolyse total, o que mostra que é esse dos constituintes conhecidos aquelle que mais resiste á acçãõ do formol.

Antes de continuar, e para melhor clareza da exposiçãõ, vamos resumidamente indicar a technica que empregãmos nestas pesquisas.

Technica: A actividade hemolytica da alexina foi sempre determinada no volume total de 4 c.c. de liquido em presençã de 1 c.c. de soluçãõ a 2,5 % de globulos de carneiro lavados e 1 c.c. de um sôro hemolytico de coelho anti-carneiro, diluido a $\frac{1}{210}$, e contendo nesse volume 30 a 40 unidades hemolysantes. A leitura da hemolyse foi geralmente feita no fim de meia hora de permanencia no banho maria a 37°.

As *fracções termo-labeis* de Ferrata foram sempre obtidas com excellent resultado pela technica de Liefmann, modificada por Braun: diluir sôro fresco em agua distillada gelada na razãõ de 1/10, fazer passar uma corrente de gaz carbonico durante 10 a 15 minutos, centrifugar a 3.500 rotações durante 5 a 10 minutos, decantar o liquido sobrenadante e reconstituir a isotonia pela addiçãõ de 1 c.c. da soluçãõ a 8,5 % de cloreto de sodio a 10 c.c. do liquido, e libertal-o finalmente do gaz carbonico por transvasamentos repetidos (Fracçãõ albumina de Ferrata, Endstück dos autores allemães). O deposito era a seguir emulsionado e lavado em agua distillada gelada saturada de gaz carbonico e, após centrifugaçãõ dissolvido em agua physiologica (Fracçãõ globulina de Ferrata, Mittelstück dos autores allemães). Sem nenhuma alteraçãõ desta technica o aspecto do precipitado de globulinas apresenta differenças sensiveis que por isso nos parece dependerem das qualidades dos sôros submettidos a esse tratamento: umas vezes, e é o que é mais frequente, o precipitado, ao redissolver-se em agua physiologica deixa um residuo difficilmente soluvel que por esmagamento com um bastonete de vidro toma um aspecto membranoso que lembra o de uma rêde de fibrina; outras vezes, o que é muito mais raro, o deposito tem um aspecto gommoso e dissolve-se facilmente e completamente no sôro physiologico. Em geral com o primeiro aspecto é a fracçãõ albumina que completa melhor os sôros de que se retirou quer o terceiro quer o quarto componente da alexina; no segundo caso é principalmente á fracçãõ globulina que cabe esse papel.

Fracções termo-resistentes: Terceiro componente. Como emulsãõ de levedo usamos uma preparaçãõ commercial denominada «Fleischmann's Yeasts» que se apresenta em tablettes constituidas por uma massa na qual os levedos estão incorporados á farinha de tapioca. O conteúdo de cada tablette era emulsionado em 20 c.c. de agua physiologica, aquecido durante

uma hora a 100° em banho maria, lavado por duas vezes em agua physiologica e o deposito finalmente emulsionado em 4 c.c. de sôro fresco de cobaya era collocado em banho maria por espaço de 2 horas a 37°. Após esse tratamento o material era centrifugado e dosado o titulo alexico do liquido sobrenadante. De regra um sôro de cobaya activo até 0,02 c.c. não dá traços de hemolyse mesmo com 0,2 c.c. depois de ter soffrido esse tratamento. O sôro após contacto com a emulsão de levedo fica ligeiramente acido mas o gráo de acidez não nos pareceu influir nos resultados que observámos e por isso pareceu-nos dispensavel neutralizal-a.

Quarto componente: Seguimos escrupulosamente a technica recomendada por Gordon, Whitehead e Wormal que nos forneceu resultados constantes e excellentes: Addicionar a cada 1 c.c. de sôro fresco de cobaya 0,25 da solução de ammonia n/6,5 deixar a mistura permanecer no banho maria a 37° por espaço de 1 hora e meia e a seguir neutralisar cuidadosamente com acido chlorhydrico n/5 isto é addicionar cerca de 0,75 c.c. de HCl n/5 a cada 4 c.c. de sôro de cobaya empregado. Terminada a preparação de cada constituinte quer termolabil quer termo-resistente, eram elles immediatamente immersos num vaso com agua gelada para melhor conservação. Com esta technica conforme se verá dos quadros adeante apresentados a differenciação destes quatro componentes é facil e perfeita.

Como acima referimos, qualquer destes constituintes da alexina é sensivel a fortes concentrações de formol e o que mais resiste é o constituinte sensivel á ammonia, de tal fórma que se pôdem obter sôros tratados pelo formol que nelles, da alexina, só esse constituinte exista activo.

Se se empregar, porém, o formaldehido em concentração mais fraca, por exemplo, de maneira a formar no sôro a diluição a 1°/° de formol do commercio, verifica-se que após 1/2 hora de banho maria a 37° o sôro de cobaya perdeu já grande parte do seu poder alexico (o titulo passou por exemplo de 0,02 c.c. para 0,2 c.c.) sem que se hajam alterado as fracções termolabeis de Ferrata, pois que a simples addição de 0,1 c.c. de sôro de cobaya, inactivado pelo calôr, permite regenerar integralmente a actividade hemolytica. Um contacto mais prolongado, por exemplo, de 1 hora a 37° permite obter um sôro que mesmo na dóse de 0,4 c.c. só dá traços de hemolyse ao passo que em presença de 0,1 c.c. de sôro de cobaya inactivado pelo calôr dá hemolyse total com 0,06 c.c. e hemolyse parcial mesmo com 0,02 c.c. Vê-se que neste ultimo caso o formol começa a alterar as fracções labeis e que essa alteração é de inicio só qualitativa, pois o titulo da hemolyse parcial corresponde exactamente ao titulo ori-

ginal da hemolyse total do sôro fresco, em summa, como se esses constituintes se tivessem transformado em productos de qualidade inferior e de acção mais lenta. O factor que o formol nessa concentração destróe é o terceiro componente da alexina, estudado por Coca, conforme se vê do seguinte quadro:

QUADRO I

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sôro formol a 1 ‰	0,2	—	—	—	0,1 cc.	0,1	0,1	—	—	—
Sôro NH ³	—	0,2	—	—	0,1 cc.	—	—	0,1	0,1	—
Sôro levedo	—	—	0,2	—	—	0,1	—	0,1	—	0,1
Sôro inact. a 56° 1/2 hora.	—	—	—	0,2	—	—	0,1	—	0,1	0,1
Agua physiologica	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Gbl. sôro hemolytico	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados após meia hora a 37°	0	0	0	0	h. t.	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.

h. t. = hemolyse total; 0 = ausencia de hemolyse

Vê-se, com effeito, que o sôro tratado pelo formol é reactivado facilmente não só pelo sôro inactivado pelo calor, como pelo sôro inactivado pela ammonia, mas pelo contrario permanece inactivo pela addição de sôro inactivado pelo levedo. Esta é em geral a regra, mas devemos assig-nalar como um facto seguramente bem observado que por vezes o sôro inactivado pelo levedo, isto é, sem o terceiro componente, é tambem capaz de reactivar o sôro inactivado pelo formol, sem que nos tenha sido possivel apprehender o determinismo do phenomeno. O certo é que dos constituintes conhecidos da alexina é o denominado terceiro componente que se mostra mais sensivel á acção do formol.

Se o contacto entre o formol a 1 ‰ e o sôro é feito a 0°, mesmo se dura por espaço de duas horas, nenhuma alteração se dá no sôro, isto é, nem mesmo o terceiro componente é inactivado, o que faz pensar que o formol age sobre o terceiro constituinte da alexina por uma acção chimica directa. Como, comtudo, o formol possui a propriedade bem conhecida de em forte concentração gelificar os sôros, propriedade que se tem querido aproveitar para o diagnostico sôrologico da syphilis (reacção de Gaté e Papacostas), concebemos possivel a hypothese de que um principio de gelificação de certas proteínas do sôro pudesse dar origem a phenomenos de adsorpção como os que sem duvida, se passam quando se adicionam aos sôros emulsões de levedos e em consequencia dos quaes desapparece o terceiro constituinte da alexina.

QUADRO II

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Sôro Formol a 1 ‰	0,2 cc.	—	—	—	0,1 cc.	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Sôro NH ³	—	0,2 cc.	—	—	0,1 cc.	—	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
Sôro levedo	—	—	0,2 cc.	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1
Sôro inactivado 56°C.	—	—	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1	—	—	—
Sôro inac. 56° Formol 1 ‰	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1	—	—
Sôro inac. 56° NH ³	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1	—
Sôro inac. 56° levedo	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1
Agua phys.	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Globulos + sôro hemolytico	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultados 1/2 h. a 37°	0	0	0	0	h. t.	0	h. t.	0	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	h. t.	0	h. t.	h. t.	0	h. t.

O mecanismo de acção dos levedos sobre esse constituinte é ainda obscuro, mas está hoje demonstrado que não é devida a substancias anti-alexicas formadas nas misturas de levedos e sôros frescos, nem tão pouco que a acidez que os levedos introduzem no sôro seja capaz de precipitar a fracção globulina de Ferrata. Segundo Whitehead, Gordon e Wormall (1925) parece certo, por isso, que o levedo inactiva o sôro de cobaya combinando-se physicamente ou chimicamente com um constituinte termo-resistente do sôro.

Uma experiencia que aqui vamos referir mostra no emtanto que mesmo essa ultima hypothese está longe de interpretar o verdadeiro processo que a bem dizer nos parece muito mais complicado. Com effeito, quando se procura retirar os componentes termo-resistentes da alexina, não do sôro fresco de cobaya mas do sôro de cobaya inactivado pelo calor 1/2 hora a 56°, verifica-se que o formol a 1°/°, após contacto de 1 hora a 37°, retira-lhe o terceiro componente, mas a emulsão de levedo nada faz. Um sôro de cobaya inactivado a 56° meia hora e tratado a seguir pela emulsão de levedos, após contacto de 2 horas a 37°, conserva a propriedade de reactivar não só o sôro inactivado pela ammonia e pelo formol, mas tambem a de reactivar um sôro fresco inactivado pela propria emulsão de levedos, conforme se vê claramente do quadro II.

Como salta aos olhos o phenomeno de inactivação do terceiro componente da alexina pelas emulsões de levedos é muito comparavel ao que se passa quando se prepara *in vitro* anaphylatoxina de Friedberger. Tanto para a inactivação do terceiro componente como para a formação de anaphylatoxina é indispensavel a presença de substancias termo-labeis do sôro. Como Bordet mostrou, a simples addição de gelose a 0,5 % a sôro, dá facilmente origem á formação de anaphylatoxina, o que não acontece se a gelose é adicionada a sôro de cobaya inactivado pelo calor. Ora, como verificámos a gelose adicionada a sôro fresco de cobaya, conforme a technica de Bordet, após contacto de 2 horas a 37°, retira do sôro o terceiro constituinte da alexina, o que não faz ao sôro inactivado pelo calor, conforme resulta do quadro III:

Por outro lado devemos acrescentar que os sôros frescos de que se retira o terceiro componente por emulsões de levedos, conforme a technica que vimos usando, são extremamente ricos em anaphylatoxina, ao passo que os sôros inactivados pelo calor, tratados por essas mesmas emulsões, não o são. Egualmente innocuas, por inoculação intravascular, são os sôros frescos ou inactivados pelo calor de que se retirou o terceiro componente pelo formol ou o quarto pela ammonia, o que demonstra que não é só a falta do 3° componente que dá ao sôro o poder toxico.

QUADRO III

TUBOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Sôro Formol	0,2	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	—	—	—	—
Sôro Gelose	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—	—	0,1	0,1	0,1	0,1
Sôro NH ³	—	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—	0,1	0,1	—	—
Sôro 56°	—	—	—	0,2	—	—	0,1	—	—	—	—	—	—
Sôro 56° Formol	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1	—
Sôro 56° Gelose	—	—	—	—	—	—	—	—	0,1	—	—	—	0,1
Agua phys.	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8	1,8
Globulos + sôro hemolytico	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.	2 cc.
Resultado	0	0	0	0	0	h. t.	h. t.	0	h. t.	h. t.	h. t.	0	h. t.

Não padece, pois, nenhuma duvida que as condições que determinam a formação da anaphylatoxina *in vitro*, nos sôros frescos, são as mesmas que presidem á inactivação, nesses sôros, do terceiro componente da alexina por determinados colloides e merece, portanto, consideração a hypothese de que essa inactivação seja devida a phenomenos de auto-proteolyse que se dão em consequencia da adsorpção por esses colloides de substancias anti-tripticas.

BIBLIOGRAPHIA

FERRATA—Berl. klin. Woch. Vol. 44, pag. 366.

SACHS e ALTMANN—Handbuch der Path. Mikroorg. (Kolle und Wassermann), Vol. 2, pag. 476.

LIEFMANN—Munch. med. Woch. Vol. 56, pag. 2097.

BROWNING and MACKIE—Zeitschr. f. Imm. Vol. 21, pag. 422.

COCA—Zeitschr. f. Imm. Vol. 21, pag. 604.

GORDON, WHITEHEAD e WORMALL—Bioch. Journal. Vol. 20, pag. 1028.

WHITEHEAD, GORDON e WORMALL.—Bioch. Journal, Vol. 18, pag. 618.
