

JOSÉ ELPIDIO BARBOSA

"DETERMINAÇÃO CINÉTICA DE ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR"

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do grau de Doutor em
Clínica Médica.

Orientador: Prof.Dr. José Oliveira de Almeida

Ribeirão Preto

1 9 8 3

Prof.Dr. José de Oliveira Almeida

À meus pais e irmã

À Regina, Carolina e André

AGRADECIMENTOS

Quero externar meus agradecimentos a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, especialmente aos Professores:

Ivan Fiore de Carvalho

Ana Isabel de Assis

Euclides Custódio de Lima Filho

às Sras. Laurentina Moro de Souza e Maria Cristina Rissato Silva.

às Srtas. Margarida Fávero, Therezinha Aparecida Cunha e Sonia Maria Stefanelli.

aos Srs. Walter Aguillar, Vanir Cândido, Adelino Rodrigues, Hêlgio de Lacerda Werneck e Francisco José dos Santos.

aos alunos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

I N D I C E

I - INTRODUÇÃO.....	01
II - MATERIAL E MÉTODOS	
1 - Complemento Humano (CH).....	10
2 - Dosagem da Solução de CH.....	10
3 - Sistema Indicador de Hemólise	
3.1 - Hemácias de carneiro.....	10
3.2 - Hemolisina.....	11
3.3 - Suspensão de células.....	11
4 - Solução diluente.....	11
5 - Substâncias Anticomplementares	
5.1 - Gama Globulina Humana Agregada.....	11
5.2 - Heparina.....	12
5.3 - Fração Ativa de Veneno de Sapo.....	12
5.4 - Zymosan.....	12
5.5 - Endotoxina.....	12
6 - Protocolo Experimental.....	13
7 - Medidas de Condutividade.....	14
III - RESULTADOS	
1 - Dosagem do CH e Preparo das Soluções com Número Definido de Unidades Hemolíticas.....	17
2 - Medida da Atividade Anticomplementar das Subs- tâncias Estudadas.....	17
3 - Determinação da d_{50}	18
4 - Reprodutibilidade do Método.....	28

5 - Atividade Anticomplementar do Zymosan e da Endo- tocina sobre o Complemento não Diluido	
5.1 - Zymosan.....	28
5.2 - Endotoxina.....	34
6 - Uso da SPR na Reconstituição do Soro Liofiliza- do: Efeito sobre a Atividade Hemolítica do CH....	37
7 - Estudo da Influência do Tempo de Incubação sô- bre Atividade Anticomplementar	
7.1 - GGHA.....	40
7.2 - Heparina.....	40
7.3 - FAV.....	41
8 - Medida da Atividade Anticomplementar Variando-se o Número de Unidades Hemolíticas de CH.....	41
IV - DISCUSSÃO.....	56
V - SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	66
VI - SUMMARY.....	68
VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

I - INTRODUÇÃO

A resposta de um organismo imunologicamente competente a um antígeno é traduzida usualmente pela produção de anticorpos. A interação entre o antígeno e o anticorpo resulta no imunocomplexo, uma forma de neutralização e eliminação do antígeno. Desta maneira a formação e remoção destes complexos constituem capítulo fundamental da defesa de um hospedeiro a patógenos ou mesmo a antígenos exógenos ou endógenos. Entretanto os imunocomplexos podem desenvolver um potencial lesivo para o organismo. A participação dos imunocomplexos na patogênese da Doença do Soro, hoje exemplo de doença por imunocomplexos, foi primeiro sugerida por von Pirquet no início do século. Cerca de 50 anos mais tarde os estudos experimentais de Germuth 1957, Germuth et al., 1957a e b além dos de Dixon et al., 1958 e 1961 vieram comprovar e ressaltar a participação dos imunocomplexos como causa de doenças. Desde então, os imunocomplexos vêm sendo identificados em um número cada vez maior de enfermidades, sejam elas infecciosas ou parasitárias, autoimunes ou malignas. O envolvimento dos imunocomplexos na patologia se revela pela participação em reações inflamatórias, onde sua deposição em tecidos pode ativar o sistema complemento resultando em lesão tecidual. Ao lado destas ações, os imunocomplexos podem estar relacionados com os processos de regulação do sistema imune, devido à capacidade de interagir com antígenos, receptores para Fc e receptores de complemento presentes na superfície de linfócitos e macrófagos.

Considerando, então, toda a importante participação dos imunocomplexos na patologia humana, sua detecção e mesmo medida tem sido exaustivamente pesquisada, no sentido de melhor conhecer sua patogenicidade e aprimorar os meios de diagnóstico e prognóstico dessas doenças. Métodos para detecção e quantificação

de imunocomplexos devem levar em conta suas características físico-químicas, propriedades biológicas além da sua deposição em tecidos ou presença em circulação. A deposição em tecidos é usualmente demonstrada através de técnicas histológicas convencionais ou histoquímicas, onde se ressalta a imunofluorescência. Os imunocomplexos circulantes podem ser detectados por métodos que identificam o antígeno específico complexado ao anticorpo ou por aqueles que são antígeno não-específicos. Raramente os antígenos participantes dos imunocomplexos são reconhecidos, o que torna o primeiro grupo de métodos muito limitado. Todavia os métodos para detecção de imunocomplexos sem o reconhecimento dos antígenos têm, a cada tempo, aumentado em número e sensibilidade. Revisões recentes (WHO, 1977; Soothill, 1977; Nielsen, 1980; Theofilopoulos, 1980; Klein e Siminovich, 1981) se ocupam em considerar as aplicações e limitações dos principais métodos para detecção de imunocomplexos circulantes. O quadro abaixo apresenta uma lista dos principais métodos antígeno não-específicos.

QUADRO I - PRINCIPAIS MÉTODOS PARA DETECÇÃO DE IMUNECOMPLEXOS CIRCULANTES, ANTÍGENO NÃO-ESPECÍFICOS. *

Métodos baseados em características físicas dos imunocomplexos

- Ultracentrifugação analítica
- Centrifugação em gradiente de densidade
- Filtração em gel
- Ultrafiltração
- Eletroforese
- Precipitação pelo PEG
- Crioprecipitação

Métodos baseados em características biológicas dos imunocomplexos

Técnicas de Complemento

- Atividade anticomplementar por fixação de complemento
- Microtécnicas de consumo de complemento
- Técnicas relacionadas com interação dos imunocomplexos com C_{1q} purificado (precipitação de C_{1q} em gel, C_{1q} precipitado pelo PEG, teste do desvio de C_{1q}, Radioimunoensaio de C_{1q} em fase sólida)
- Técnicas de produtos de clivagem de C₃ e C₁
- Método da precipitação de C₃
- Radioimunoensaio para congulinina

Técnicas de Antiglobulinas

- Testes com Fator Reumatoide
- Outros

Técnicas Celulares

- Teste de agregação plaquetária
- Inibição da ADCC
- Coloração intracitoplasmática de leucócitos polimorfo nucleares
- Liberação de enzimas de eosinófilos e mastócitos
- Teste de inibição de macrófagos
- Teste de inibição de rosetas
- Teste com células Raji
- Teste com célula L1210 de leucemia

Outros Métodos

- Ligação à proteína A de estafilococos

* Traduzido e adaptado de: Theofilopoulos, A.N.. Evaluation and Clinical Significance of Circulating Immune Complexes, in Schwartz, R.S. (Ed.): Progress in Clinical Immunology, Vol. 4, Grune & Stratton, New York, 1980.

Entre as vantagens, desvantagens e limitações destes métodos, são destaques a simplicidade e sensibilidade da medida de atividade anticomplementar através métodos de fixação de complemento (Soothill, 1977). A atividade anticomplementar dos imunocomplexos pode ser medida pelo consumo do complemento, expresso pela capacidade de o imunocomplexo inibir a ação hemolítica do complemento sobre um sistema indicador. Entretanto, não apenas a ligação de imunocomplexos a C_{1q} pode levar à ativação e consumo do complemento hemolítico. Também agregados de imunoglobulina G e M possuem capacidade semelhante e são comparáveis aos imunocomplexos em atividade sobre o complemento (Ishizaka et al., 1967; Augener, Cooper e Müller-Eberhard, 1971; Nielsen e Svehag, 1976). Formas diferentes de interação exibem outras substâncias. Assim, inibição da atividade hemolítica do complemento pode ser obtida pela ação de heparina e outros polianions (Wising, 1937; Roth, 1965; Rent et al., 1975; Raeppe, Hill e Loos, 1976; Loos Volanakis e Stroud, 1976a e b), por endotoxina (Marcus, Shin e Mayer, 1971; Mergenhagen, Snyderman e Phillips, 1973), Zymosan (Brade et al., 1973), entre outros. Como consequência, uma limitação à medida de imunocomplexos por métodos de fixação de complemento seria a interação destas substâncias, algumas

presentes no soro do portador de imunocomplexos, com o complemento resultando em consumo ou inibição não proporcionais à quantidade de imunocomplexos. Uma forma de se contornar esta dificuldade é proceder a separação dos imunocomplexos por métodos físico-químicos anteriormente à interação com o complemento (Harkiss e Brown, 1979).

Os métodos de fixação ou consumo de complemento podem detectar ação anticomplementar decorrentes da interação de substâncias que agem sobre as vias clássica ou alternativa. A substituição, no sistema indicador de hemólise, da hemácea de carneiro por hemáceas de coelho além da adição de um quelante de íons Ca^{++} , possibilita detectar atividade sobre a via alternativa (Polhill, Pruitt e Johnston Jr, 1978; Jones, 1979). Os métodos para medida de atividade anticomplementar, baseados em fixação de complemento, podem ainda ser estáticos ou cinéticos. Os métodos estáticos determinam as quantidades restantes do complemento, que sofrem ação da substância anticomplementar, após um período de tempo em que toda a reação hemolítica deve ter ocorrido, ou seja, são titulações estáticas do ponto final (Plescia, Amiraian e Heidelberger, 1956). As relações entre complemento restante e atividade da substância anticomplementar são expressas das mais variadas maneiras, como porcentagem de inibição da atividade do complemento, porcentagem do complemento restante e outras.

Por outro lado, os métodos cinéticos permitem o seguimento da reação hemolítica até um ponto definido, geralmente, como a metade do tempo necessário para se completar a reação. Em outras palavras, correlaciona-se o tempo para que 50% da reação hemolítica ocorra e a quantidade de complemento remanescente da ação da substância anticomplementar.

O Quadro II resume a revisão de literatura que relaciona os principais métodos para medida de atividade anticomplementar, estáticos ou cinéticos.

QUADRO II - MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR, QUE UTILIZAM TÉCNICAS DE FIXAÇÃO OU CONSUMO DE COMPLEMENTO.

MÉTODOS	AUTOR(ES)	FONTE DE COMPLEMENTO	OBSERVAÇÕES
E S T A	Walton, K.W.; Ellis, H.A. e Taylor, C.E.D. (1957)	Soro de cobaia	Medem a porcentagem de inibição da hemólise, pela diferença entre a densidade óptica de cada tubo teste e a do controle com 100% de hemólise. A concentração da substância anticomplementar capaz de inibir 50% da atividade do complemento é chamada de IC ₅₀ . Não define o número de unidades de complemento utilizadas.
T I C	Shulman, N.R.; Barker, L.F. (1969)	Soro humano ou de cobaia	Expressam o título de fixação de complemento como a recíproca da diluição máxima do soro capaz de fixar mais que 2 unidades de complemento em quantidade ótima de anticorpo. Utilizam 10 unidades CH ₅₀ de complemento.
O S	Johnson, A.H.; Mowbray, J.F.e Porter, K.A. (1975) Johnson, A.H.e Mowbray, J.F. (1977)	Soro de cobaia	Medem o complemento restante após incubação do soro com imune complexos com 2,0 a 2,5 UCH ₅₀ , a través da fórmula: $UCH_{50} = \frac{-\log 50}{\log (100 - \% \text{lise})}$

MÉTODOS	AUTOR (ES)	FONTE DE COMPLEMENTO	OBSERVAÇÕES
ES TÁ TI COS	Nielsen, H. e Svehag, S.E. (1976)	Soro de cobaia	A atividade anticomplementar do soro ou IgG agregada é expressa como a porcentagem de inibição da liberação de hemoglobina do controle (no ponto correspondente a UCH ₅₀). Não define o número de unidades de complemento utilizadas.
C I	Vargues, R.; Moraud, B. e Gonthier, F. (1964)	Soro de cobaia	Método utiliza autoanalisador Technicon e mede a velocidade de hemólise dada por 5UCH ₅₀ de complemento com e sem γ -globulina agregada.
N E T	Siedentopf, HG. Lauenstein, K. Fischer, H. (1965) Lauenstein, K. Siedentopf, HG. e Fischer, H. (1965)	Soro de cobaia	Medem o tempo para que 50% das hemáceas sensibilizadas sejam lisadas pelo complemento (tl/2). Utiliza número definido de UCH ₅₀ . Define a Unidade de Inibição como a concentração da substância anticomplementar capaz de dobrar o tl/2 do controle.
I C O S	Boackle, R.J. e Pruitt, K.M. (1974)	Soro humano	Calculam a concentração de complemento através equação do tipo von Krogh, onde relaciona tempo para 50% de hemólise, concentração de complemento e inclinação desta relação. Refere que agregados de IgG e IgA alteram estas medidas. Não especifica como mede a atividade anticomplementar nem o número de unidades de complemento utilizadas.

MÉTODOS	AUTOR(ES)	FONTE DE COMPLEMENTO	OBSERVAÇÕES
C I	Polhill, R.B.; Pruitt, K.M. e Johnston, R.B. Jr. (1978)	Soro humano, de cobaia, galinha e camundongos	Método cinético para via alternativa. Medem o tempo para que 50% dos eritrócitos de coelho disponíveis sejam lisados ($t_{1/2}$). Relação entre $t_{1/2}$ e diluição do soro é expresso por equação tempo-dependente de von Krogh, podendo ser calculado o título do soro.
N E T	Harkiss, G.D. e Brown, D.L. (1979)	Soro humano	Medem a capacidade de os <u>imune</u> complexos consumirem complemento. Após incubação tubos contendo <u>com</u> plemento submetido aos <u>imune</u> complexos e tubo controle têm <u>ativi</u> dade hemolítica determinada por método cinético (Lachman, Hobart e Aston, 1973). Resultado é expresso como porcentagem de <u>com</u> plemento consumido ou porcentagem do valor do controle.
I C	Jones, B.M. (1979)	Soro humano	Mede o tempo para lise de 50% dos eritrócitos de carneiro sensibilizados (via clássica) ou de coelho (via alternativa), para determinar a atividade hemolítica do soro humano.
O S	Doherty, N.S. (1981)	Soro de rato	Determina o tempo para lise de 50% dos eritrócitos de coelho sensibilizados, produzida pelo soro de rato com ou sem a substância anticomplementar. A concentração da droga capaz de inibir 50% da <u>ativi</u> dade hemolítica do soro é <u>cha</u> mada I50 e calculada a partir da relação entre porcentagem de <u>ini</u> bição <i>versus</i> concentração da droga.

Considerando, então, as vantagens oferecidas pelos métodos de fixação de complemento — simplicidade aliada à sensibilidade — a heterogeneidade metodológica observada na literatura e a dificuldade na comparação dos resultados de diferentes autores, decidimos padronizar um método que fosse capaz de detectar e medir atividade anticomplementar, baseado nesta técnica. As limitações atribuídas aos métodos que se utilizam de fixação do complemento, na verdade, constituíram um estímulo a seu estudo, já que havia a possibilidade de se detectar e medir atividade sobre o complemento de substâncias que não os imunocomplexos, além destes. Como objetivo adicional, procuramos conhecer melhor o comportamento de diferentes substâncias anticomplementares frente a um método cinético de fixação de complemento. A possibilidade de aplicação de análise matemática, característica comum dessa metodologia, prenunciava a obtenção de parâmetros bem definidos capazes de acentuar a reprodutibilidade e comparabilidade do método padronizado.

Mais ainda, o estudo de substâncias de ações anticomplementares não conhecidas, como no caso de uma fração de veneno de sapo, comparado com o de substâncias de mecanismo de atuação sobre o complemento já esclarecidos permitiria até elaborar inferências sobre o modo de agir das primeiras.

Finalmente, resumindo, o trabalho objetivou padronizar um método para estudo de atividade anticomplementar, capaz de detectar e medir a ação de imunocomplexos e/ou outras substâncias sobre o complemento, reprodutível, comparável e suficientemente simples e sensível.

II - MATERIAL E MÉTODOS

1 - COMPLEMENTO HUMANO (CH)

Foi utilizada uma mistura de soros de doadores humanos normais, selecionados entre alunos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Esta mistura foi distribuída em ampolas no volume de 5,0 ml e em seguida liofilizada¹. Quando do seu uso reconstituía-se pela adição de 4,0 ml de água destilada e 1,0 ml de solução preservadora de Richardson (SPR), (Almeida e Fife, 1976) ou por 5,0 ml de água destilada.

2 - DOSAGEM DA SOLUÇÃO DE CH

Após reconstituída e sempre que necessário, a solução de CH era submetida à determinação de sua unidade hemolítica (ko) e inclinação (ho), pelo método padronizado por Almeida e Fife, 1976.

3 - SISTEMA INDICADOR DE HEMÓLISE

3.1. Hemácias de carneiro: foram obtidas de animais pertencentes ao biotério geral da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Coleta, conser

1. Centrifugal Freeze Dryer

Model 30/ PI 574

Edwards High Vacuum Ltd. England

vação e preparo de uma suspensão contendo cerca de $1,2 \times 10^9$ eritrócitos por ml, correspondente a uma suspensão corrente de 5%, obedeceram o prescrito na Publicação Científica nº 319 da OPS (Almeida e Fife, 1976).

3.2. Hemolisina: a solução de hemolisina se empregou em dose de máxima sensibilização. Utilizou-se hemolisina do lote nº 770214, de título de sensibilização máxima 1:500, preparada segundo técnica de Ulrich e Mac Arthur, 1942.

3.3. A suspensão de células indicadora de hemólise foi obtida por mistura volume a volume da suspensão de hemácias de carneiro e da solução de hemolisina.

4 - SOLUÇÃO DILUENTE

Para todas as diluições empregou-se a solução salina isotônica, boratada, e acrescida de cálcio ($1,5 \times 10^{-4}M$) e magnésio ($5 \times 10^{-4}M$). Preparou-se uma solução estoque 10 vezes concentrada, que era diluída quando do uso.

5 - SUBSTÂNCIAS ANTICOMPLEMENTARES

5.1. Gama Globulina Humana Agregada (GGHA): foi empregada suspensão a 1% GGHA de preparo comercial¹ agregada pelo

1. Gama Globulina "Behring"

Lote ABA - Data de Fab. 1/80

aquecimento a 63°C por 30 minutos. Alíquotas de 1,0 ml desta suspensão foram congeladas para uso posterior.

- 5.2. Heparina: foi utilizada a solução de preparo comercial de heparina¹ contendo 5.000 UI por ml, correspondente a 50 mg de heparina. Esta solução foi mantida sob refrigeração a 4°C, até o uso.
- 5.3. Fração ativa de Veneno de Sapo (FAV): foi fornecida gentilmente pela Professora Dra. Ana Isabel de Assis do Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Uma solução de FAV na concentração de 0,27 mg por ml permaneceu congelada até as dosagens.
- 5.4. Zymosan: utilizou-se uma suspensão de Zymosan² na concentração de 5 mg por ml. Alíquotas de 1,0 ml desta suspensão foram congeladas para uso posterior.
- 5.5. Endotoxina: empregou-se solução de lipopolissacáride B de E. coli³ na concentração de 100 µg por ml. Alíquotas desta solução foram congeladas até a utilização.

1. Liquemine - "Roche"

Lote 61287 - Data de Fab. 24/07/81

2. Fleischmann Laboratories

3. Difco Laboratories

Control: 469643

6 - PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Em tubos de ensaio adequados para utilização como cuvetas de espectrofotometria, foram distribuídas diluições da substância anticomplementar a ser testada, no volume de 0,1 ml para cada tubo. As diluições foram feitas, geralmente, segundo uma progressão geométrica. O tubo controle continha igual volume da solução diluente. Uma solução de CH foi preparada de modo a conter 20 unidades hemolíticas em cada 2,0 ml, deixada estabilizar por 10 minutos à temperatura ambiente, e acrescentada a cada tubo, neste volume. A mistura foi agitada suavemente por inversão dos tubos e deixada em banho-maria a 37°C durante 30 minutos, na maioria dos ensaios. Terminado o período de incubação, 0,4 ml da suspensão de hemácias sensibilizadas foram adicionados a cada tubo, com o auxílio de um pipetador automático, tão rápido quanto possível. A ordem de colocação do sistema indicador se fez do tubo de maior concentração da substância anticomplementar até o tubo controle. Quando o tubo controle recebeu as hemácias sensibilizadas, imediatamente um cronômetro foi acionado. Todos os tubos receberam suave agitação e, sempre mantidos a 37°C, passou-se à leitura espectrofotométrica da turbidez. Utilizou-se para estas medidas um espectrofotômetro Coleman Junior¹ com porta-cuvetas adaptado para manter temperatura de 37°C, através da circulação de água aquecida em seu interior, gerada por

1. Coleman Instruments Inc.

Model: 6A Nº A-35671

Maywood, Ill., USA.

um aparelho de banho-maria Julabo¹ (Fig. 1). As medidas foram feitas em comprimento de onda 700 nm. O zero de turvação foi ajustado utilizando-se o tubo controle antes da colocação do sistema indicador. Leu-se em primeiro lugar o tubo controle. A densidade óptica (DO) no tempo zero foi verificada e o tempo para que esta DO se reduzisse à metade ($t_{1/2}$) foi anotado. Os demais tubos foram lidos sucessivamente em ordem crescente da sua concentração em substância anticomplementar, e seus $t_{1/2}$ registrados. Ao final da última leitura o cronômetro foi desligado (Fig. 2).

7 - MEDIDAS DE CONDUTIVIDADE

Foram realizadas em amostras de soro humano reconstruído com ou sem SPR, em 10 diluições correspondentes à atividade hemolítica de 5 até 50 UCH₅₀.

O volume de cada amostra era de 4,0 ml e as medidas foram feitas à temperatura de 37°C. Utilizou-se um condutivímetro² cuja constante da célula é igual a 12,5 cm⁻¹.

-
1. Juchhein Labortechnik
Typ. Paratherm U-4 N° 123
West Germany
 2. Konduktometer E 527
Metrohm Herisau, Switzerland

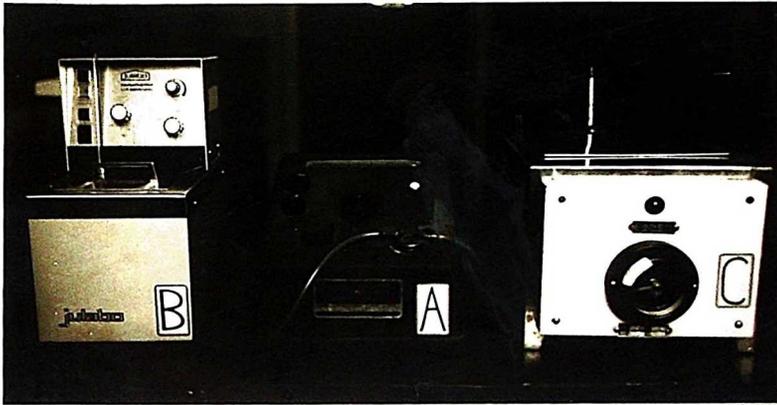


FIGURA 01 - Conjunto de aparelhos para medida da atividade anticomplementar.

- A** - Espectrofotômetro com porta-cuvetas adaptado.
- B** - Banho-maria com circulação de água aquecida.
- C** - Banho-maria comum, para incubação.

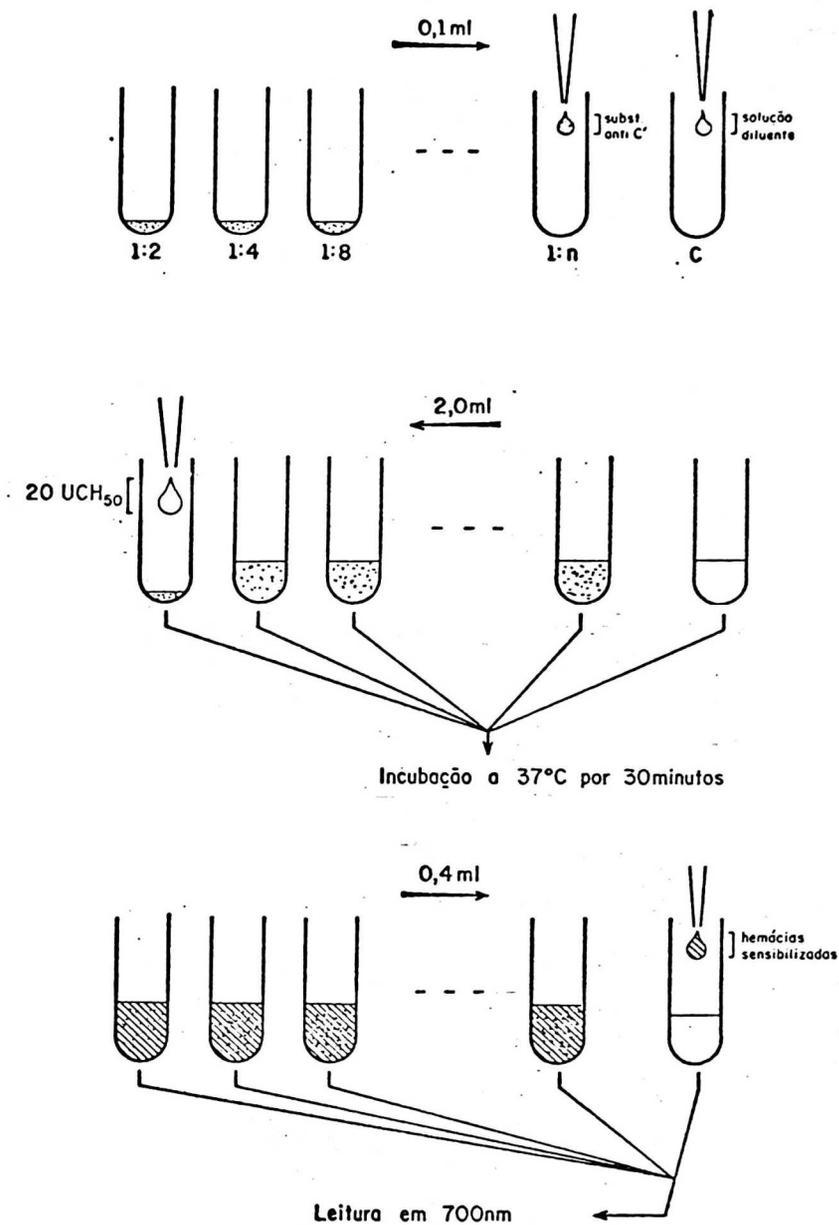


FIGURA 02 - Fluxograma do método cinético para determinação de atividade anticomplementar.

III - RESULTADOS

1 - DOSAGEM DO CH E PREPARO DAS SOLUÇÕES COM NÚMERO DEFINIDO DE UNIDADES HEMOLÍTICAS

O CH com ou sem SPR era dosado logo após a reconstituição. A unidade hemolítica variou pouco de uma para outra ampola reconstituída e esteve em torno de $K_0 = 0,0036$ ml com $h_0 = 0,38$. As soluções que recebiam SPR e mantidas sob refrigeração eram novamente dosadas a cada 3 dias, verificando-se uma queda da atividade hemolítica, ocorrida espontaneamente, de pequena monta. A partir do conhecimento do k_0 preparavam-se as soluções de CH para trabalho, com número definido de unidades.

2 - MEDIDA DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DAS SUBSTÂNCIAS ESTUDADAS

O método utilizado e as condições dos experimentos foram descritas detalhadamente em Material e Métodos. Para todas as substâncias testadas havia a necessidade de um ensaio preliminar para se determinar a faixa de diluição adequada. Desta forma, 10 diluições ao dobro ou ao triplo da substância teste eram preparadas e determinava-se, aproximadamente, a diluição capaz de inibir 50% da atividade hemolítica do CH. A partir de então escolhiam-se as diluições adequadas, capazes de produzir inibições mensuráveis da atividade hemolítica do CH, maiores e menores que 50%.

Vários ensaios foram realizados para cada uma das substâncias testadas: GGHA, heparina, FAV, Zymosan e endotoxina. Todos os experimentos utilizaram soluções de CH; do mesmo lote,

reconstituído e preservado pela SPR. Foram empregadas 20 UCH₅₀ de CH por tubo de ensaio para todas as substâncias com exceção da FAV em que se utilizou 10 UCH₅₀. A incubação foi feita a 37°C por 30 minutos excepto para a FAV em que o tempo foi de 60 minutos. O número de diluições utilizado bem como a razão e faixa de diluição é apresentado, para cada substância testada, no corpo e legenda das tabelas.

As tabelas I, II e III expressam os resultados das medidas de atividade anticomplementar para GGHA, heparina e FAV, respectivamente.

Nas mesmas condições experimentais já indicadas não foi possível detectar atividade anticomplementar para a suspensão de Zymosan e solução de endotoxina.

3 - DETERMINAÇÃO DA d₅₀

A d₅₀ foi definida como a dose da substância anticomplementar capaz de inibir 50% da atividade hemolítica do CH, nas condições padronizadas do método.

A d₅₀ pode ser calculada por método gráfico ou matemático. Projetando-se em abcissa as quantidades de substância anticomplementar e em ordenada os percentuais de inibição da atividade hemolítica do CH, obtém-se uma curva que é característica para cada substância testada. O estudo da curva indicou o melhor processo para sua retificação. Para as drogas anticomplementares ensaiadas neste trabalho, dois tipos de curvas foram obtidos: a reta para a GGHA (Fig. 3) e a potencial para heparina e FAV (Figs. 4 e 5).

TABELA I - MEDIDA DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DA G.G.H.A.

TUBO	DILUIÇÃO*	GGHA (μg)	$t_{1/2}$ (s)	% I
C	-	-	191	-
6	1:118	8,5	213	10
5	1:88	11,4	225	15
4	1:66	15,2	249	23
3	1:50	20,0	302	37
2	1:37	27,0	401	52
1	1:28	35,7	795	76

* Razão de diluição: 0,75

Tubo C = controle

TABELA II - MEDIDA DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DA HEPARINA

TUBO	DILUIÇÃO *	HEPARINA (μ g)	$t_{1/2}$ (s)	% I
C	-	-	197	-
6	1:160	31,3	225	12
5	1:80	62,5	244	19
4	1:40	125,0	300	34
3	1:20	250,0	413	52
2	1:10	500,0	597	67
1	1:5	1.000,0	957	79

* Razão de diluição: 0,5

Tubo C = controle

TABELA III - MEDIDA DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DA F.A.V.

TUBO	DILUIÇÃO *	FAV (μ g)	$t_{1/2}$ (s)	INIBIÇÃO (%)
C	-	-	383	-
5	1:32	1,7	440	13
4	1:16	3,4	470	19
3	1:8	6,8	555	31
2	1:4	13,5	655	42
1	1:2	27,0	1.065	64

* Razão de diluição: 0,5

Tubo C = controle

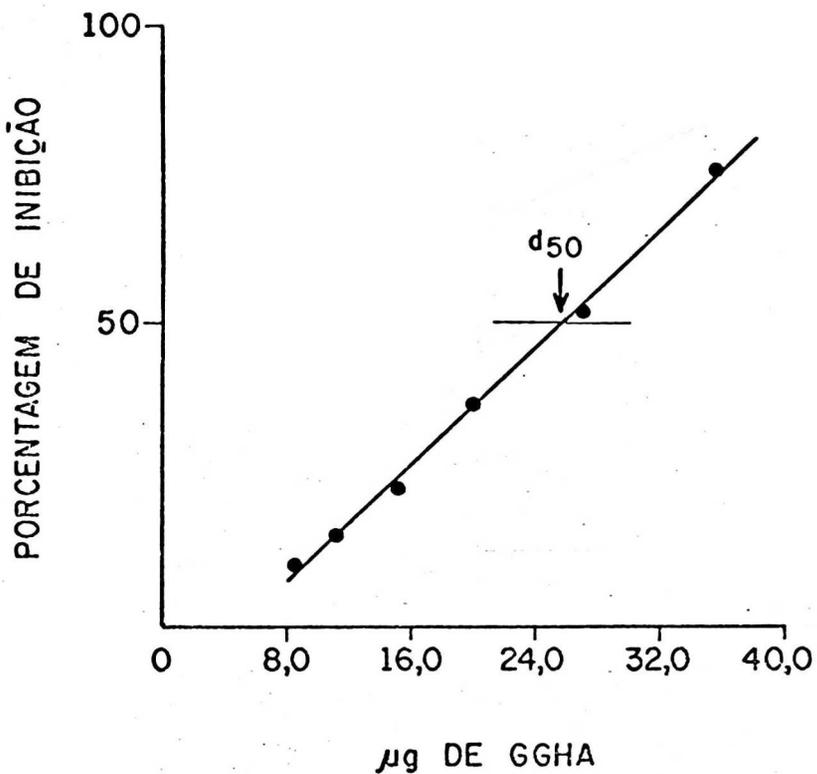


FIGURA 03 - Relação entre quantidades de GGHA e porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH. A d_{50} se encontra indicada. Equação correspondente: $y = 2,45x - 12,50$; $r^2 = 0,99$; $d_{50} = 25,56 \mu\text{g}$.

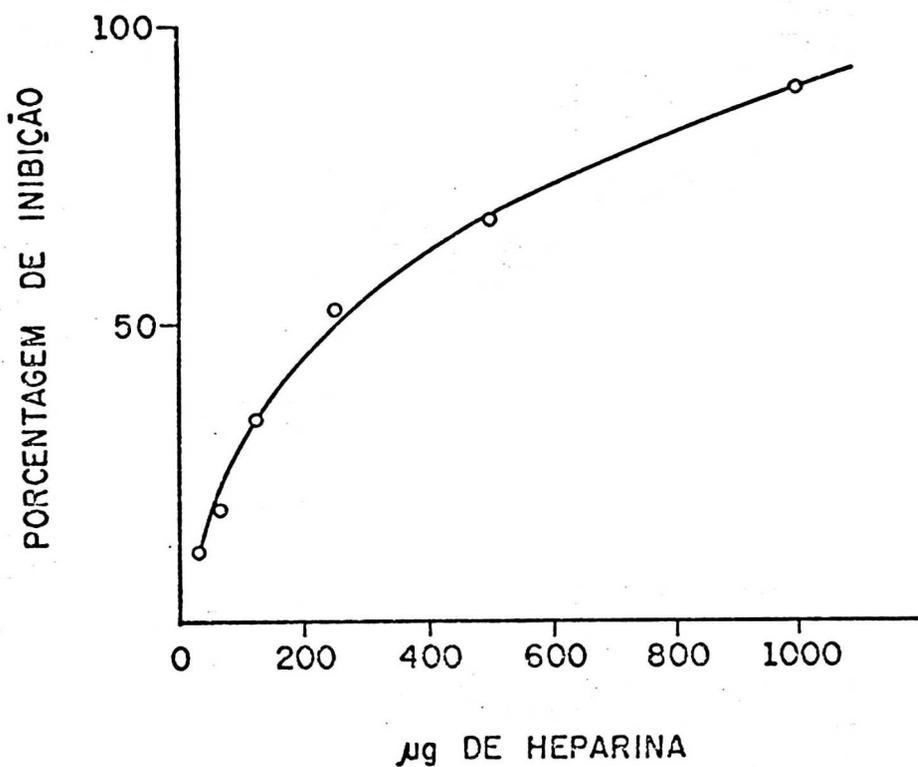


FIGURA 04 - Relação entre quantidades de heparina e porcentagem de inibição da atividade hemolítica do CH.

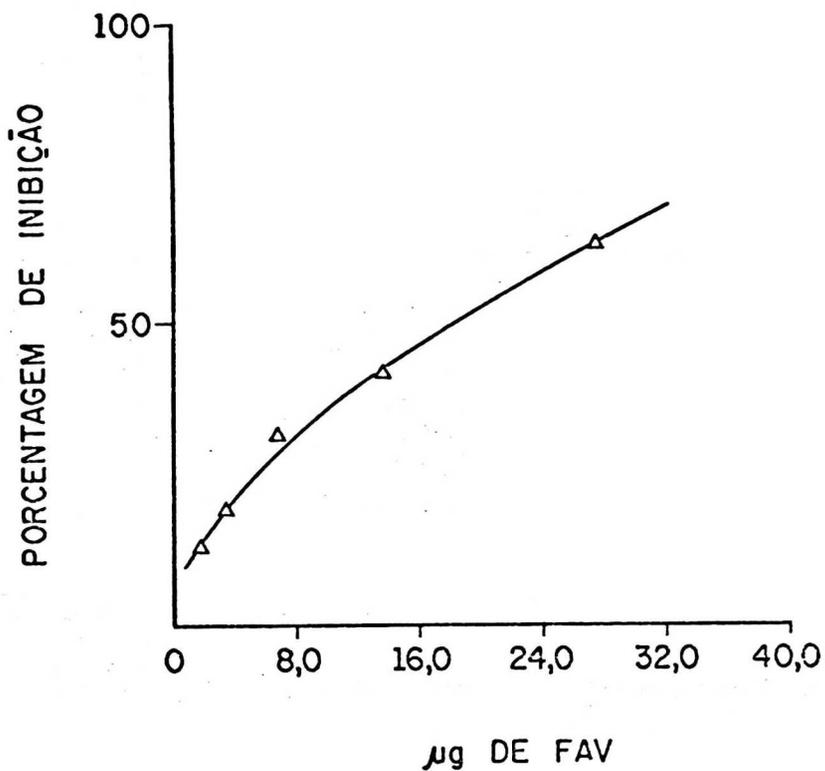


FIGURA 05 - Relação entre quantidades de FAV e porcentagem de inibição da atividade hemolítica da CH.

Para retificar a curva potencial da heparina utilizamos a transformação logística dos percentuais de inibição e logarítmica decimal das quantidades de substância anticomplementar. A curva potencial da FAV foi retificada pela transformação em logaritmos decimais dos percentuais de inibição e das quantidades da substância anticomplementar.

Retificadas as curvas resultantes, a d_{50} é representada pelo ponto da abcissa correspondente à intersecção da reta com uma linha paralela à abcissa e originada na ordenada igual a 50%. Nas transformações *logito versus log*, esta linha é a própria abcissa, já que logito de 50% é igual a zero.

Matematicamente a determinação da d_{50} é o cálculo de x para $y = 50\%$, nas equações $y = k + hx$ (para a reta da GGHA) e $y = k x^h$ (para as curvas potenciais), onde:

x = quantidade de substância anticomplementar para $y\%$ de inibição da atividade do CH.

k = intersecção com o eixo da ordenada.

h = inclinação da relação linear entre x e y .

y = percentual de inibição da atividade do CH dada por x de substância anticomplementar.

As equações transformadas para retificação, são escritas:

logito $Y = \log k + h \log x$, onde logito Y é igual a $\log y/1-y$, para a heparina;

e $\log y = \log k + h \log^x$, para a FAV.

As Figuras 3, 6 e 7 e respectivos parâmetros das regressões lineares são exemplos demonstrativos da aplicação do conceito de d_{50} acima descrito.

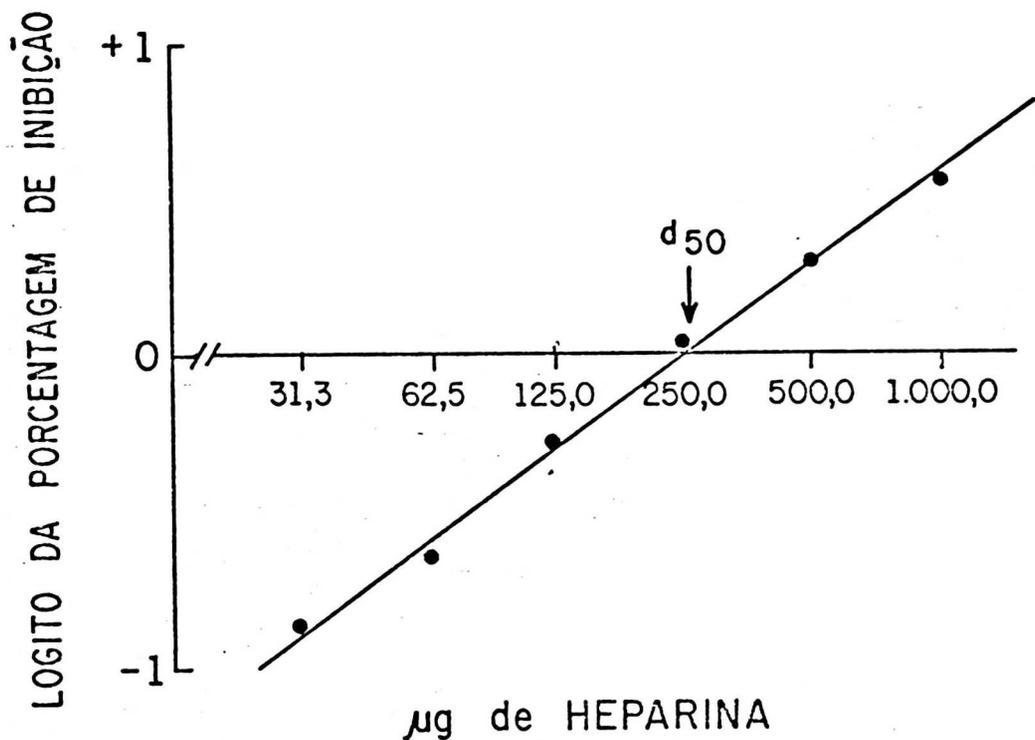


FIGURA 06 - Relação entre quantidade de Heparina (log) e porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH (logito). A linha horizontal representa o logito de 50% de inibição e a d_{50} é indicada. Equação correspondente: $y/1-y = 0,004x^{0,98}$
 $r^2 = 0,99$; $d_{50} = 247,8 \mu\text{g}$.

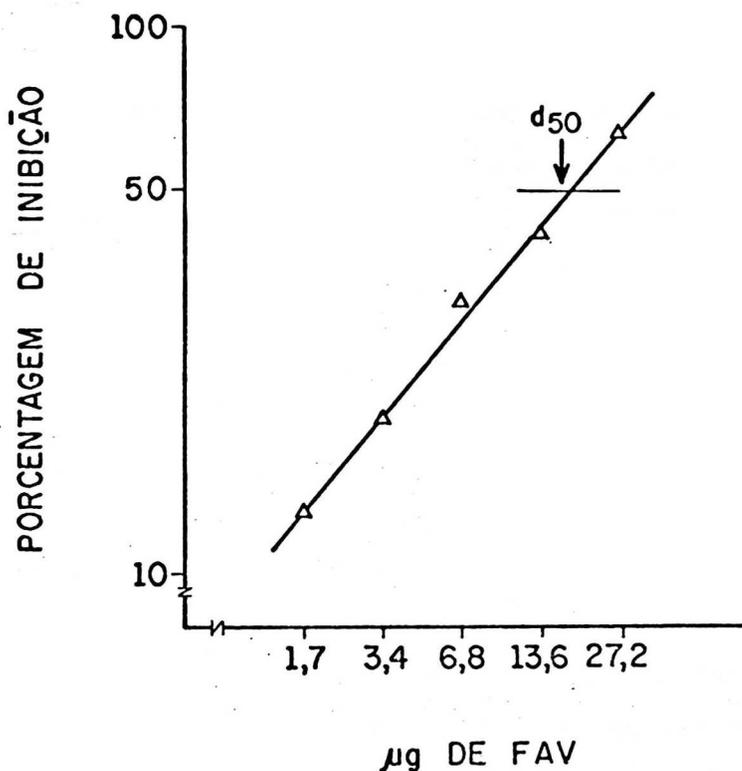


FIGURA 07 - Relação entre quantidades de FAV (log) e porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH (log). A d_{50} se encontra indicada. Equação correspondente é $y = 0,096x^{0,57}$; $r^2 = 0,99$; $d_{50} = 17,4 \mu\text{g}$.

4 - REPRODUTIBILIDADE DO MÉTODO

Foram feitos 5 experimentos sucessivos (A, B, C, D e E) para a medida da atividade anticomplementar da heparina e da GGHA. Todos os ensaios foram realizados no mesmo período do dia, pela mesma pessoa, utilizando os mesmos reagentes e o método descrito anteriormente.

O CH foi reconstituído e preservado pela SPR. Todos os tubos, de todos os experimentos receberam 20 UCH₅₀ e igual período de incubação, ou seja, 30 minutos a 37°C. Os resultados em quintuplicata, são apresentados nas Tabelas IV e V nas Figuras 8, 9 e 10. O número de diluições, razão e faixa de diluição aparecem no corpo e legenda das Tabelas. Pode-se observar que a variação é mínima entre os ensaios, sendo apenas pouco mais perceptível no grupo da GGHA, porém sem significância estatística. Saliente-se, ainda, que o perfil gráfico de cada ensaio para GGHA e para heparina obedece sempre ao padrão da substância, ou seja, retas para a GGHA e curvas potenciais para a heparina.

5 - ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DO ZYMOZAN E DA ENDOTOXINA SOBRE COMPLEMENTO NÃO DILUÍDO

5.1. Zymozan

Tubos contendo a suspensão estoque de Zymozan foram descongelados e centrifugados a 2.000 rpm, durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e ao sedimento de dois tubos foi acrescentado 0,5 ml da solução de CH

TABELA IV - MEDIDAS DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DA GGHA, EM QUINTUPLICATA

TUBO	DILUIÇÃO*	GGHA (µg)	E X P E R I M E N T O S				
			A	B	C	D	E
			$t_{1/2}(s)$ %I	$t_{1/2}(s)$ %I	$t_{1/2}(s)$ %I	$t_{1/2}(s)$ %I	$t_{1/2}(s)$ %I
C			190	191	188	186	186
6	1:118	8,5	212 10	213 10	210 10	207 10	202 8
5	1:88	11,4	220 14	225 15	217 13	214 13	217 14
4	1:66	15,2	247 23	249 23	241 22	234 21	229 19
3	1:50	20,0	318 40	302 37	293 36	289 36	270 31
2	1:37	27,0	420 55	401 52	392 52	370 50	337 45
1	1:28	35,7	825 77	795 76	693 73	655 72	517 64

* Razão de diluição: 0,75
Tubo C = controle

TABELA V - MEDIDAS DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DA HEPARINA, EM QUINTUPLICATA

TUBO	DILUIÇÃO	HEPARINA (µg)	E X P E R I M E N T O S				
			A	B	C	D	E
			$\frac{t_{1/2}(s)}{\%I}$	$\frac{t_{1/2}(s)}{\%I}$	$\frac{t_{1/2}(s)}{\%I}$	$\frac{t_{1/2}(s)}{\%I}$	$\frac{t_{1/2}(s)}{\%I}$
C			197	194	197	198	198
6	1:160	31,3	225 12	223 13	223 12	227 13	226 12
5	1:80	62,5	244 19	254 24	252 22	268 26	257 23
4	1:40	125,0	300 34	313 38	314 37	314 37	317 38
3	1:20	250,0	413 52	428 55	428 54	417 53	420 53
2	1:10	500,0	597 67	622 69	618 68	618 68	610 68
1	1:5	1.000,0	957 79	1.001 81	1.015 81	993 80	979 80

* Razão de diluição: 0,5

Tubo C = controle

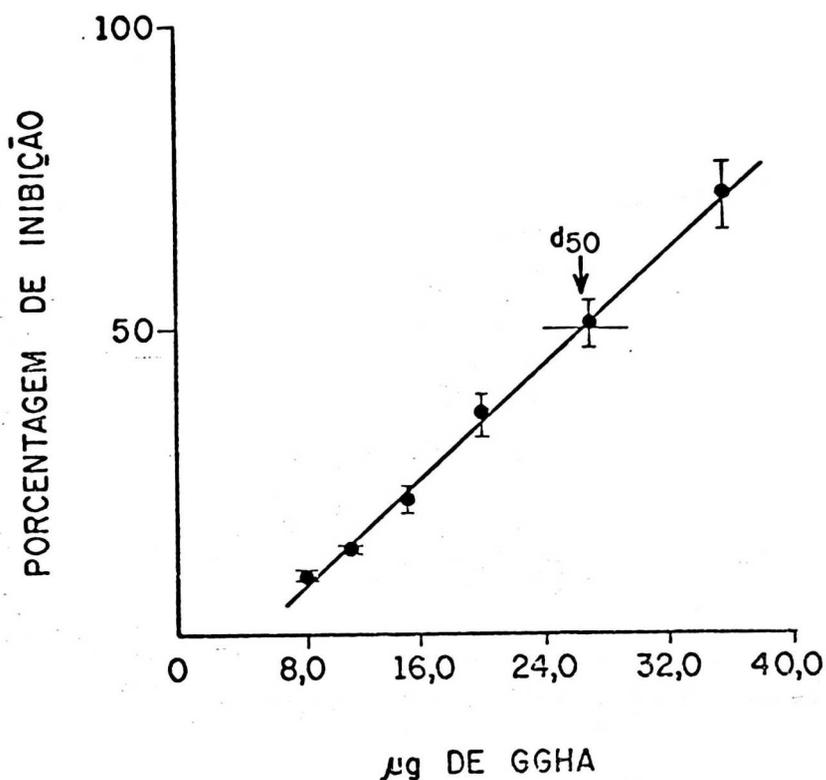


FIGURA 08 - Relação linear entre quantidades de GGHA e as médias aritméticas das porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH. Experimento em quintuplicata. A equação obtida pela regressão comum é $y = 2,36x - 12,22$; $r^2 = 0,99$; $d_{50} = 26,41 \mu\text{g}$.

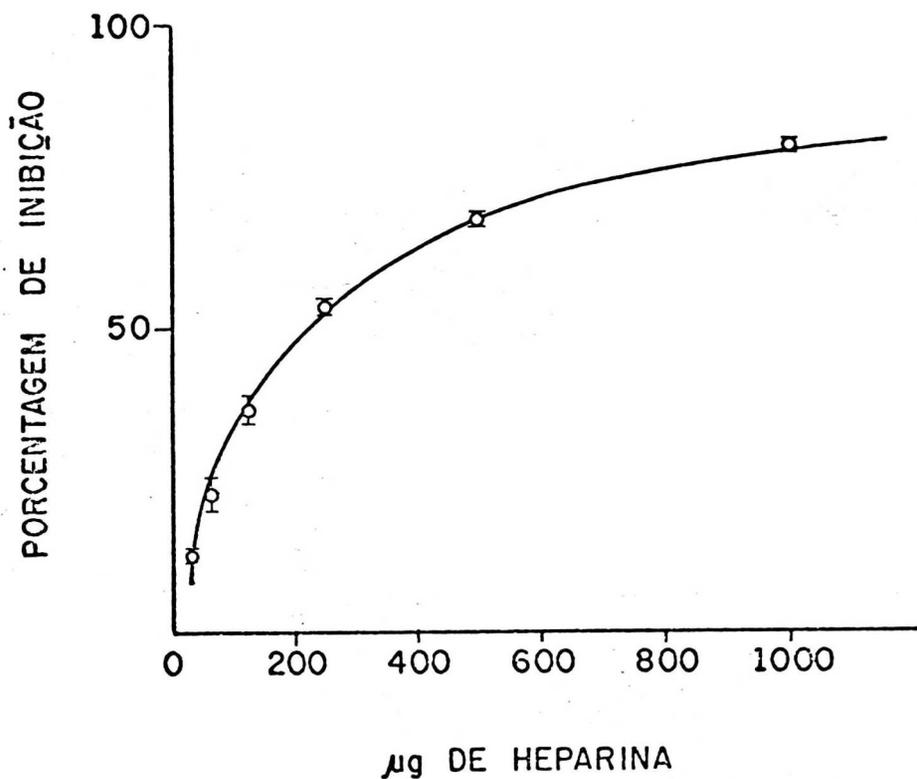


FIGURA 09 - Relação entre quantidades de heparina e as médias aritméticas das porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH. Experimento em quintuplicata.

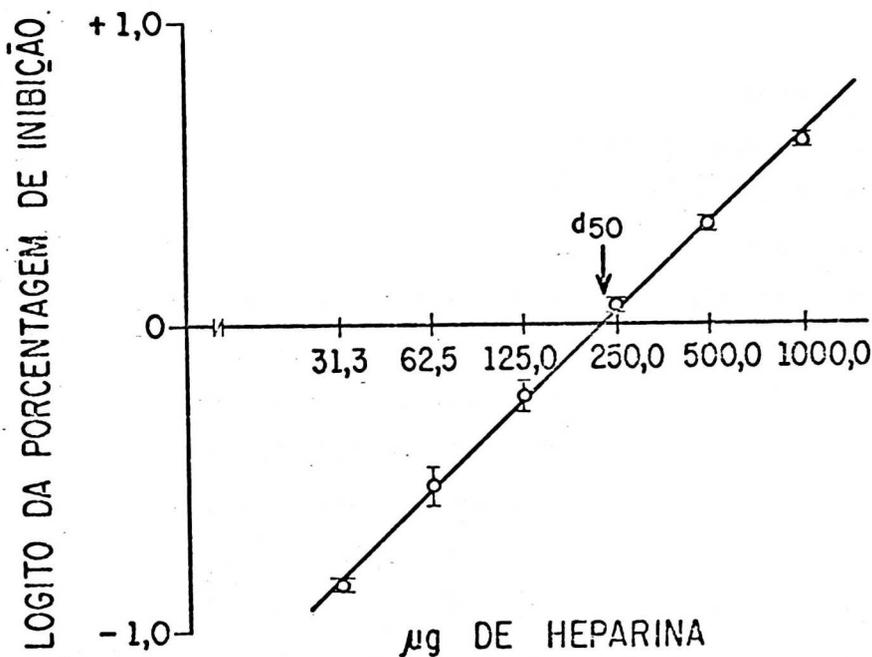


FIGURA 10 - Relação entre quantidades de heparina (log) e as médias aritméticas das porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH (logito). Experimento em quintuplicata. A equação obtida pela regressão comum é $y/1-y = 0,0054 x^{0,96}$; $r^2 = 0,99$; $d_{50} = 226,0 \mu\text{g}$.

reconstituída e preservada por SPR e, a outros dois tu bos 0,5 ml de CH reconstituído apenas com água destilada, ambos não diluídos. Agitou-se suavemente e, as suspensões formadas, foram incubadas em banho-maria a 37°C durante 30 e 60 minutos. Tubos controle com apenas solução de CH, preservado ou não preservado, em volumes idênticos aos experimentais tiveram a mesma incubação, com defasagem de 10 minutos em relação aos experimentais. Após a incu bação todos os tubos foram centrifugados a 2.000 rpm durante 10 minutos; retirou-se 0,1 ml do sobrenadante e transferiu-se para tubos de ensaio especiais para medi das espectrofotométricas. Completou-se o volume até 2,0 ml com solução salina diluente, previamente aquecida a 37°C. Acrescentou-se, então, 0,4 ml de hemácias sensibi lizadas a cada tubo e o cronômetro imediatamente foi acionado. Prodeceu-se à medida do $t_{1/2}$ para cada tubo, iniciando-se pelos controles, de 30 e 60 minutos. Os re sultados são apresentados nas Tabelas VI e VII.

5.2. Endotoxina

Procedimento semelhante ao anterior, sem as centrifuga ções, foi efetuado para a Endotoxina de E.coli. A quanti dade de endotoxina foi de 0,1 ml da solução estoque, para cada tubo. Os tubos controle receberam solução salina em vez de substância testada. Os resultados são expressos nas Tabelas VIII e IX.

A observação das Tabelas VI e VIII permite concluir que o Zymosan e a endotoxina exibem atividades anticomplementares, men suráveis, quando incubados com o CH reconstituído apenas com água destilada e não diluído. Por outro lado, nas Tabelas VII e IX

TABELA VI - MEDIDA DA AÇÃO DO ZYMOSAN SOBRE A ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO CH RECONSTITUÍDO

TUBO	TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)			
	30		60	
	$t_{1/2}$ (s)	% I	$t_{1/2}$ (s)	% I
CONTROLE	135		145	
ZYMOSAN	190	29	300	52

TABELA VII - MEDIDA DA AÇÃO DO ZYMOSAN SOBRE A ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO CH RECONSTITUÍDO E COM SPR

TUBO	TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)			
	30		60	
	$t_{1/2}$ (s)	% I	$t_{1/2}$ (s)	% I
CONTROLE	248		242	
ZYMOSAN	227	0	226	0

TABELA VIII - MEDIDA DA AÇÃO DA ENDOTOXINA DE E. COLI SOBRE A
ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO CH RECONSTITUÍDO

TUBO	TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)			
	30		60	
	$t_{1/2}$ (s)	% I	$t_{1/2}$ (s)	% I
Controle	185		198	
Endotoxina	205	10	247	20

TABELA IX - MEDIDA DA AÇÃO DA ENDOTOXINA DE E. COLI SOBRE A
ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO CH RECONSTITUÍDO E COM SPR

TUBO	TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)			
	30		60	
	$t_{1/2}$ (s)	% I	$t_{1/2}$ (s)	% I
Controle	240		241	
Endotoxina	234	0	245	1,6

nota-se que a presença da SPR na reconstituição do soro é capaz de bloquear a inibição da atividade hemolítica do CH.

6 - USO DA SPR NA RECONSTITUIÇÃO DO SORO LIOFILIZADO:

EFEITO SOBRE A ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO CH

Este experimento foi delineado devido a alteração de força iônica determinada pela adição da SPR ao soro. Foram preparadas soluções de CH, preservado e não preservado pela SPR, contendo cada uma 50 unidades hemolíticas para cada 2.0 ml. As soluções foram mantidas em banho de gelo-água e, a partir destas, foram preparadas por diluição com solução diluente, novas soluções no volume de 2,0 ml, com número definido de unidades hemolíticas. Desta forma 10 medidas foram efetuadas para CH reconstituído com e sem SPR tendo o número de unidades hemolíticas variado de 5 a 50 com intervalos de 5 unidades entre si. Os tubos de reação recebiam 2,0 ml da solução de CH, deixados estabilizar por 10 minutos a 37°C, a seguir acrescentava-se 0,4 ml da suspensão de hemácias sensibilizadas e o $t_{1/2}$ era registrado. Efetuou-se também medidas de condutividade em todas as diluições de complemento preservado e não preservado. O volume das amostras foi de 4,0 ml e as medidas feitas a 37°C. Dos resultados, apreciáveis na Tabela X e Figura 11, depreende-se que a utilização da SPR na reconstituição do soro humano liofilizado altera a atividade hemolítica do CH, perceptível quando se empregam diluições contendo 25 UCH₅₀ ou mais, nas condições aqui estabelecidas.

TABELA X - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO SALINA DA SPR SOBRE A ATIVIDADE HEMOLÍTICA DO CH

CH (UCH ₅₀)	COM SPR		SEM SPR	
	t _{1/2} (s)	C (mS)	t _{1/2} (s)	C (mS)
5	849	16,4	540	14,3
10	316	18,3	238	16,3
15	227	19,5	172	16,8
20	204	20,6	145	16,8
25	197	21,6	127	16,9
30	200	22,6	116	16,9
35	208	23,5	107	17,0
40	217	24,4	98	17,0
45	240	25,3	95	17,1
50	263	26,0	91	17,1

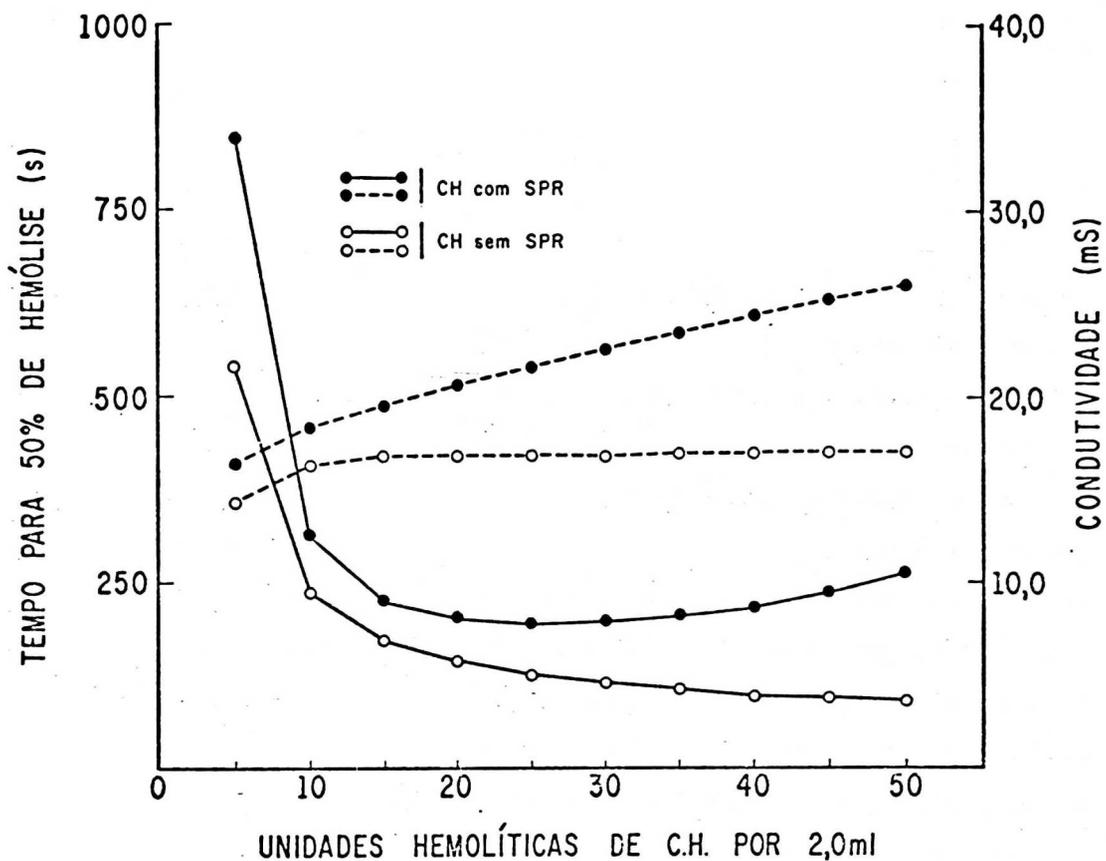


FIGURA 11 - Efeito da presença de SPR na reconstituição do soro sobre a atividade hemolítica do CH. As linhas cheias representam atividade hemolítica do CH com e sem SPR; as tracejadas, as correspondentes medidas de condutividade. Os círculos abertos representam o CH sem SPR e os círculos fechados o CH com SPR.

7 - ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO TEMPO DE INCUBAÇÃO SOBRE ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR

7.1. GGHA

Mediu-se o $t_{1/2}$, como já descrito acima, de uma suspensão de GGHA diluída de 1:60 em relação à estoque, em tempos que variaram de 0 a 120 minutos, com intervalos de 10 minutos entre uma e outra medida. Em cada tubo de ensaio especial foram colocados 0,1 ml da suspensão de GGHA e 2,0 ml da solução de CH preservado, contendo 20 unidades hemolíticas. Os tubos controle receberam 0,1 ml de solução salina diluente e a mesma quantidade de CH. Todos os tubos experimentais tiveram seus controles individuais. A seguir foram colocados em banho-maria a 37°C , respeitando-se uma defasagem de tempo que permitisse a leitura dos $t_{1/2}$. No tempo zero de incubação, o complemento se encontrava em banho de gelo-água. A cada 10 minutos de incubação acrescentava-se ao tubo controle e a seguir ao experimental correspondente, 0,4 ml da suspensão de hamácias sensibilizadas. O $t_{1/2}$ era, então, medido.

7.2. Heparina

Ensaio semelhante foi realizado tomando-se como substância anticomplementar a heparina. Utilizou-se soluções de heparina diluídas a 1:30 em relação à estoque. As medidas foram feitas em tempos que variaram de 0 a 120 minutos com intervalos de 15 minutos entre cada medida.

7.3. FAV

Para a FAV procedeu-se de forma semelhante às anteriores. A solução estoque foi diluída a 1:8. As medidas foram realizadas em tempos de 0 a 100 minutos, com intervalos de 20 minutos entre cada leitura.

Os resultados destes três experimentos são apresentados nas Tabelas XI, XII e XIII. As Figuras 12 e 14 mostram o comportamento semelhante entre a GGHA e FAV quando incubado com CH em diferentes tempos, ou seja, a porcentagem de inibição que estas substâncias impõem à atividade hemolítica do complemento aumenta com o tempo de incubação. Em contrapartida, para a heparina, tal não se verifica (Fig. 13).

8 - MEDIDA DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR VARIANDO-SE O NÚMERO DE UNIDADES HEMOLÍTICAS DE CH.

Efetou-se, para a heparina e para a GGHA, medidas de atividade anticomplementar variando-se o número de unidades hemolíticas em cada ensaio. Assim, foram feitos ensaios utilizando 10, 20, 30, 40 e 50 unidades hemolíticas de CH sem SPR. A solução mãe de CH era mantida em banho de gelo-água. As diluições das substâncias anticomplementares foram feitas a partir dos estoques e ajustadas para que se obtivesse percentuais de inibição da atividade do complemento maiores e menores que 50%. As Tabelas XIV e XV expressam estes resultados.

Como se observa pelas Figs. 15 e 17 comportamento da GGHA e da heparina frente à variação do número de unidades de CH nos ensaios, se aproxima. Ambas as substâncias anticomplementares apresentam d_{50} variando de acordo com o número de unidades de CH do experimento.

**TABELA XI - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTICOMPLEMENTAR DA GGHA SOBRE O CH**

TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)	$t_{1/2}$ (s)		% I
	CONTROLE	GGHA	
zero	310	352	12
10	217	300	28
20	218	350	38
30	235	400	41
40	228	440	48
50	235	510	54
60	236	770	69
70	237	736	68
80	243	951	74
90	241	1.000	76
100	240	1.275	81
110	245	1.920	87
120	242	3.130	92

**TABELA XII - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTICOMPLEMENTAR DA HEPARINA SOBRE O CH**

TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)	$t_{1/2}^{(s)}$		% I
	CONTROLE	HEPARINA	
zero	277	438	37
15	218	393	45
30	222	410	46
45	232	411	44
60	239	409	42
75	246	417	41
90	250	430	42
105	257	428	40
120	259	443	42

**TABELA XIII - EFEITO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO NA ATIVIDADE
ANTICOMPLEMENTAR DO FAV SOBRE O CH**

TEMPO DE INCUBAÇÃO (MINUTOS)	$t_{1/2}$ (s)		% I
	CONTROLE	FAV	
zero	307	335	8
20	283	372	24
40	317	467	32
60	341	535	36
80	365	751	51
100	410	1.132	64

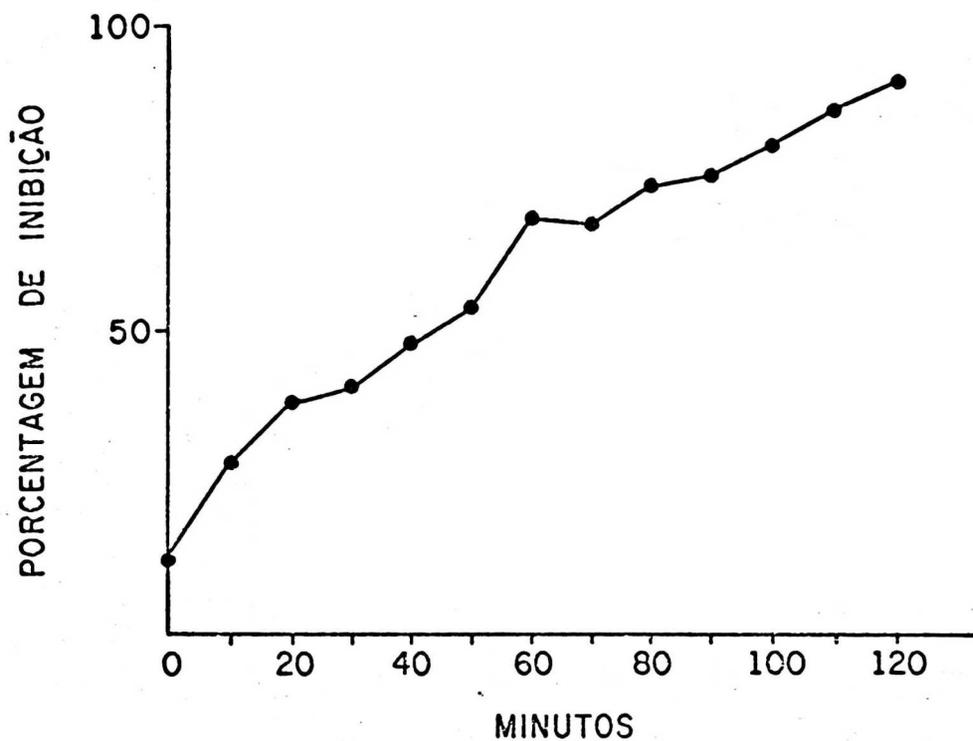


FIGURA 12 - Relação entre o tempo de incubação e a atividade anticomplementar da GGHA so bre o CH.

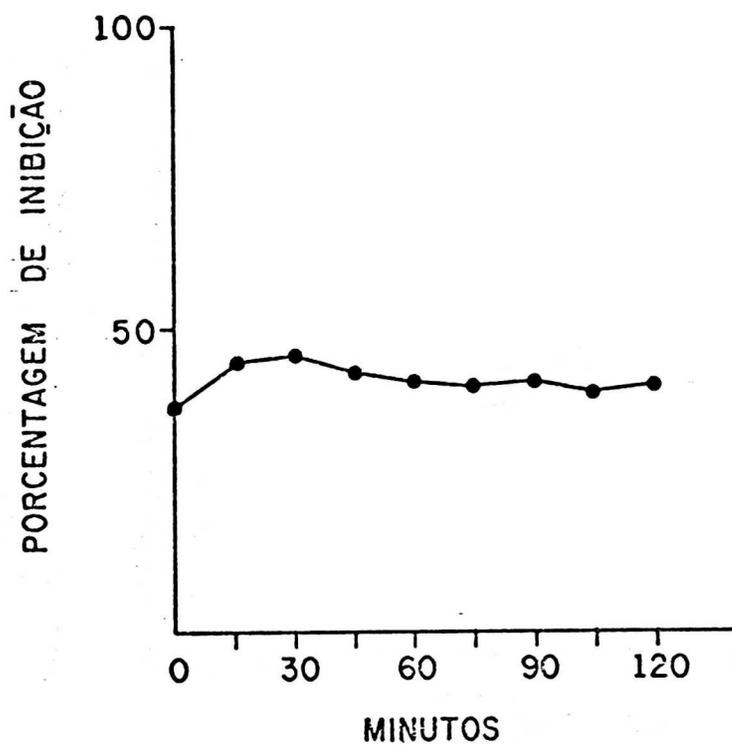


FIGURA 13 - Relação entre o tempo de incubação e a atividade anticomplementar da heparina sobre o CH.

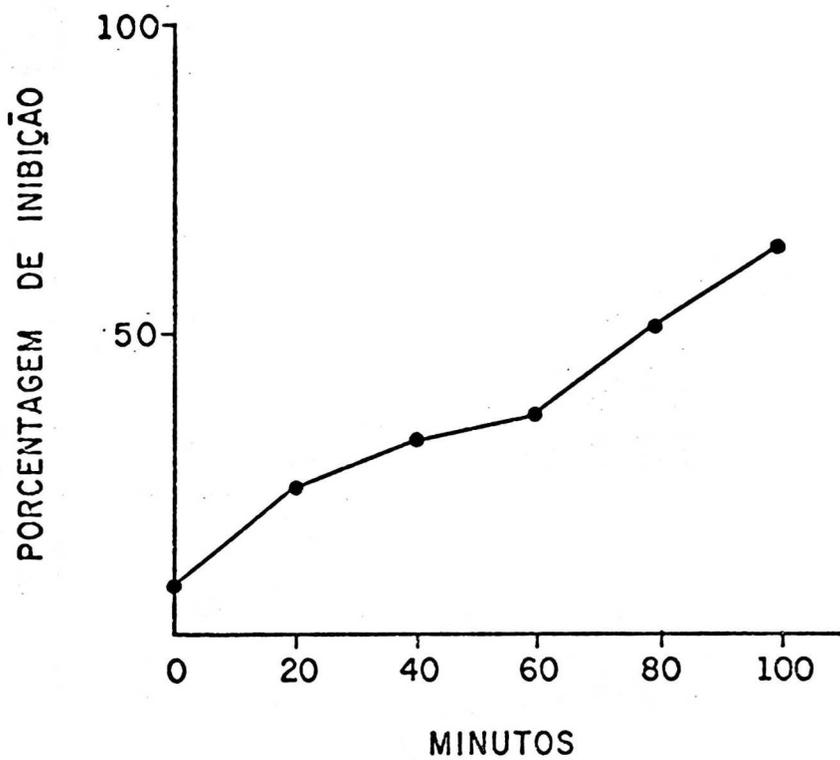


FIGURA 14 - Relação entre o tempo de incubação e a atividade anticomplementar da FAV so bre o CH.

TABELA XIV - MEDIDAS DE ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DA GGHA, VARIANDO-SE O NÚMERO DE UNIDADES HEMOLÍTICAS DO CH

GGHA* (µg)	UNIDADES					
	10		20		CH ₅₀	
	t _{1/2} (s)	%I	t _{1/2} (s)	%I	t _{1/2} (s)	%I
Controle	277		157		119	100
3,6	346	20				
4,8	383	28				40
6,4	430	36				t _{1/2} (s)
8,5	510	46				%I
11,4	802	65	235	33	154	23
15,2			282	44	170	30
20,0			380	59	202	41
27,0			620	75	277	57
35,7					438	73
47,6						
	d ₅₀ = 8,9µg		d ₅₀ = 17,4µg		d ₅₀ = 24,3µg	d ₅₀ = 31,4µg
						d ₅₀ = 37,7µg

* Razão de diluição: 0,75

TABELA XV - MEDIDAS DA ATIVIDADE ANTICOMPLEMENTAR DA HEPARINA, VARIANDO-SE O NÚMERO DE UNIDADES HEMOLÍTICAS DO CH

TUBO	DILUIÇÃO* HEPARINA (µg)	CH (UCH ₅₀)									
		10		20		30		40		50	
		t _{1/2} (s)	%I								
C		290		132		106		92		87	
5	1:128	39,0	23	164	20	124	15	107	14	102	15
4	1:64	78,0	39	207	36	158	33	132	30	120	28
3	1:32	156,0	55	297	56	225	53	182	49	165	47
2	1:16	312,0	71	432	69	323	67	266	65	248	65
1	1:8	624,0	84	674	80	497	79	415	78	378	77
		d ₅₀ =125,88µg		d ₅₀ =142,50µg		d ₅₀ =164,38µg		d ₅₀ =181,59µg		d ₅₀ =186,44µg	

* Razão de Diluição: 0,5
Tubo C = controle

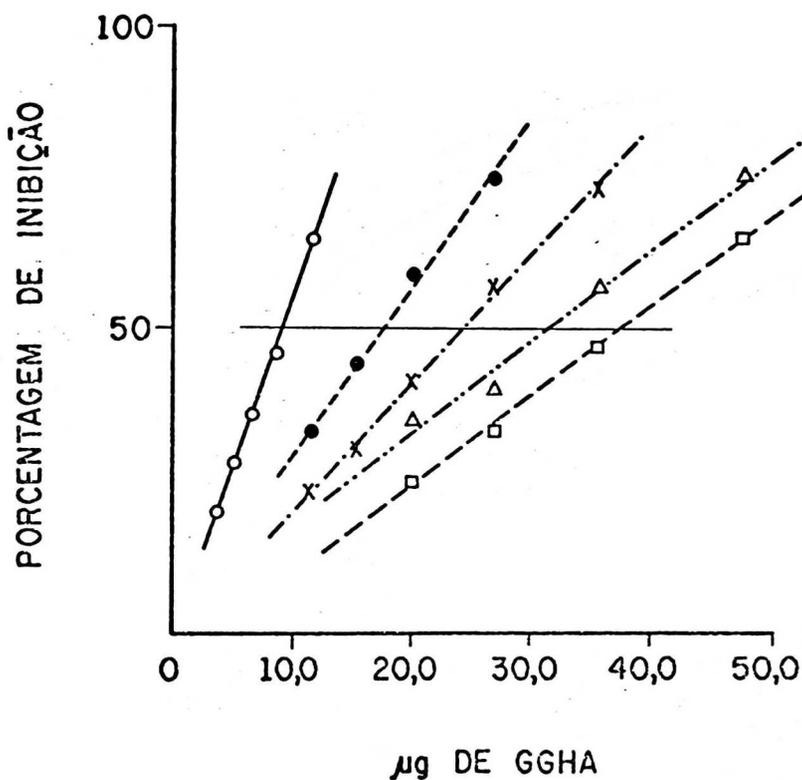


FIGURA 15 - Relações lineares entre quantidades de GGHA e porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH, nos experimentos com variação do número de UCH_{50} . A linha horizontal corresponde a 50% de inibição. Legenda: o—o 10 UCH_{50} , o---o 20 UCH_{50} ; x---x 30 UCH_{50} , Δ --- Δ 40 UCH_{50} , — 50 UCH_{50} .

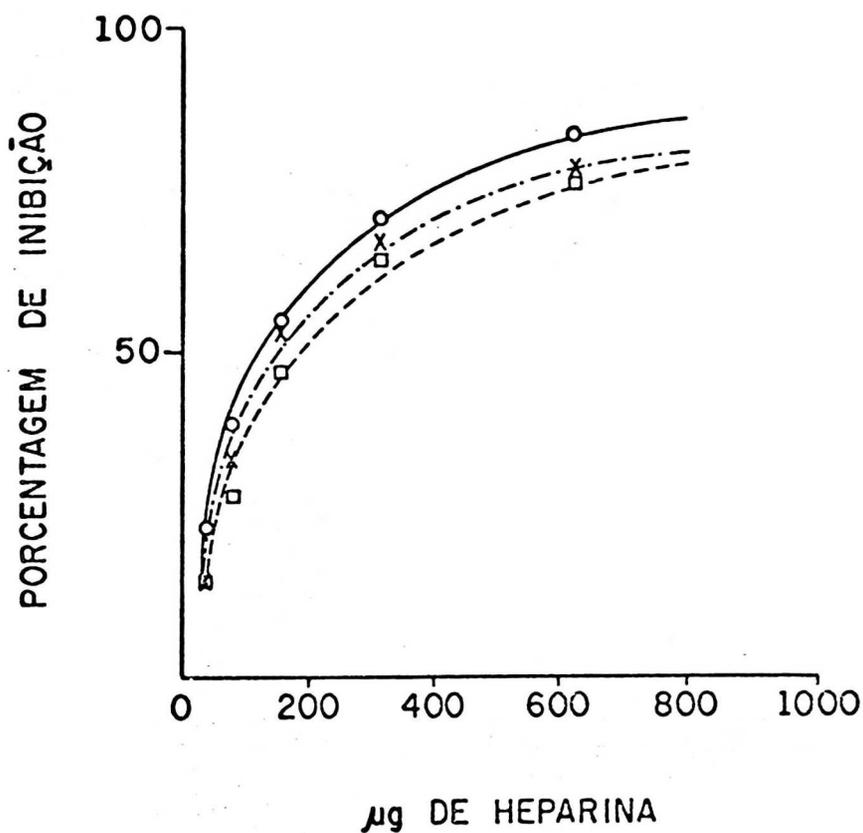


FIGURA 16 - Relações entre quantidades de heparina e porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH, nos experimentos com variação do número de UCH₅₀. Legenda: ○—○ 10 UCH₅₀, x - - - x 30 UCH₅₀, — · — 50 UCH₅₀.

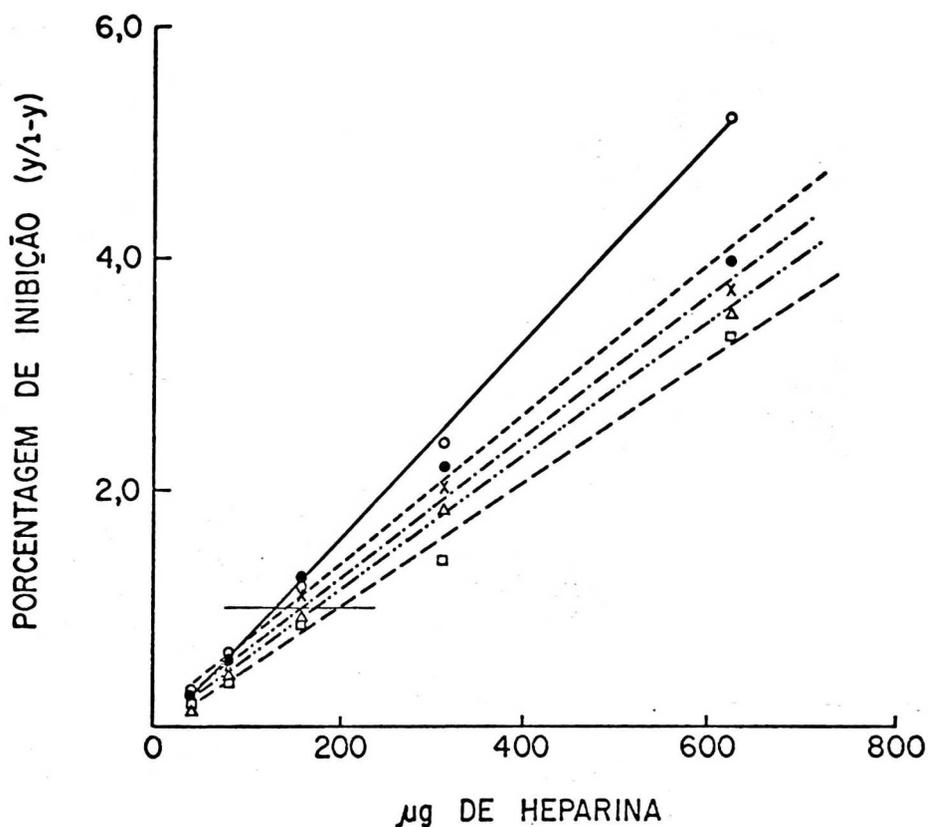


FIGURA 17 - Relações lineares entre as quantidades de heparina e as razões $y/1-y$ (y = porcentagens de inibição da atividade hemolítica do CH), nos experimentos com variação do número de UCH_{50} . A linha horizontal corresponde a 50% de inibição ($y=0,5$). Legenda: $\circ-\circ$ 10 UCH_{50} , $\circ-\cdots-\circ$ 20 UCH_{50} , $x-\cdots-x$ 30 UCH_{50} , \cdots 40 UCH_{50} , $-\cdots-$ 50 UCH_{50} .

É interessante observar-se que os perfis das curvas obtidas para GGHA e para heparina obedecem aos padrões já verificados anteriormente (Figs. 15 e 16).

Finalmente, as Figs. 18 e 19 apresentam as relações que existem entre d_{50} e número de unidades de CH_{50} utilizadas para medi-las, sendo linear para a GGHA e logarítmica (*log versus'log*) para a heparina.

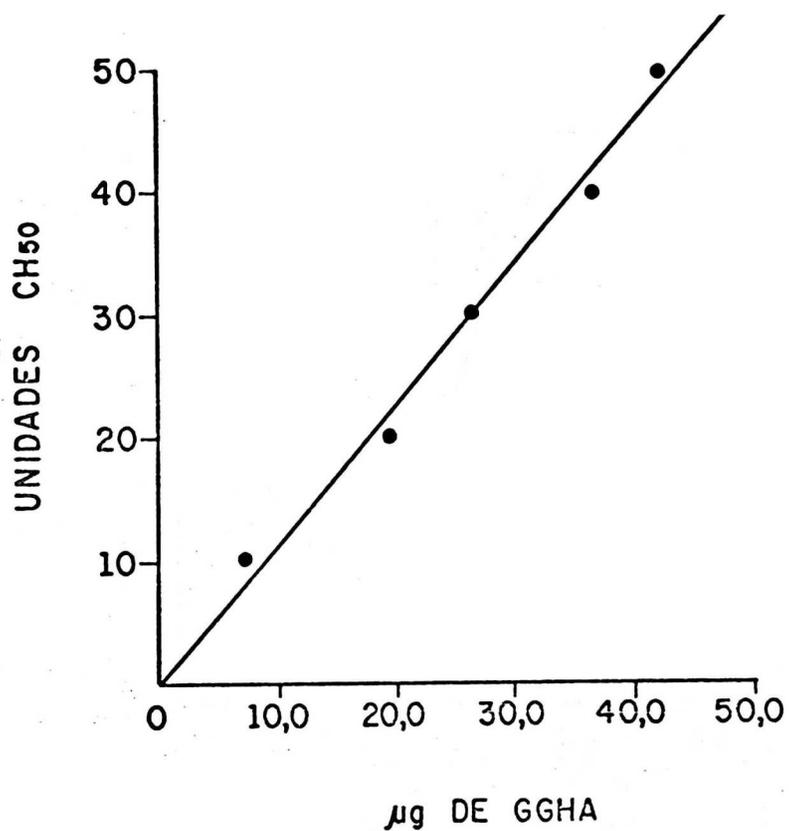


FIGURA 18 - Relação linear entre quantidades de GGHA necessárias para 50% de inibição da atividade hemolítica do CH e unidades hemolíticas do CH.

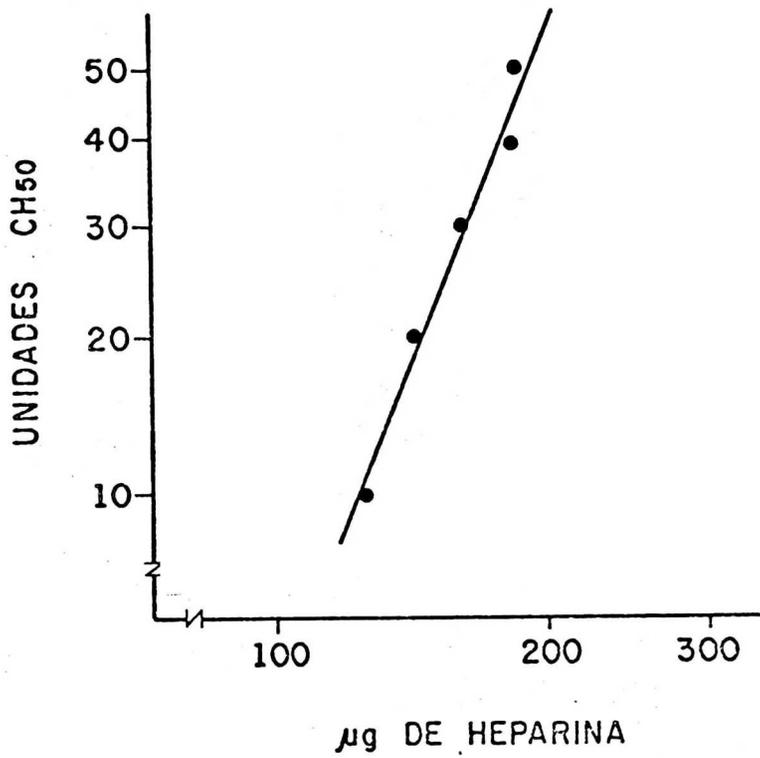


FIGURA 19 - Relação entre quantidades de heparina necessárias para 50% de inibição da atividade hemolítica do CH (log) e unidades hemolíticas CH₅₀ (log).

I V - D I S C U S S Ã O

Métodos para medir atividade anticomplementar, fundamentados nas propriedades líticas do sistema complemento, têm utilizado soro de animais de laboratório, em maior frequência de coabaia, ou soro humano como fonte de complemento. Neste trabalho decidimos utilizar soro humano pela vantagem de o método uma vez padronizado, ser mais facilmente aplicável à investigação clínica, visto que assim não há a necessidade de se considerar possíveis diferenças de atividade entre complementos de espécies diferentes.

O soro humano e a hemolisina foram coletados e tituido por hemácias de carneiro e hemolisina, foram coletados e preparados em quantidade suficiente para o desenvolvimento de toda a fase experimental. Procuramos com isto reduzir a um mínimo as variações destes reagentes, que pudessem interferir com a padronização do método e com sua reprodutibilidade. Com a mesma intenção, a dosagem periódica da atividade hemolítica do complemento proporcionou que utilizássemos sempre um número definido de unidades CH_{50} .

A determinação da atividade anticomplementar, através método cinético de fixação de complemento, foi por nós preferido em razão de sua simplicidade, maior rapidez de execução e iguais reprodutibilidade e precisão em relação aos experimentos estáticos. Estas considerações estão em acordo com o exposto por Plescia, A miraian e Heidelbergger, em 1955.

A padronização metodológica aqui descrita apresentou algumas soluções técnicas que agilizaram o método. Assim, a incubação a um só tempo de todas as concentrações das substâncias anticomplementares e seus respectivos controles com as soluções de complemento, a adição das hemácias sensibilizadas quase que a um

só tempo e a sucessiva leitura da hemólise resultaram numa expres
siva economia de tempo.

Os ensaios preliminares realizados com cada substância
a ser testada permitiram a escolha adequada da melhor faixa de
concentração, evitando repetições frequentes para ajuste da escala
operacional, além da imprecisão decorrente do registro de percen
tuais de inibição de hemólise muito acima ou muito abaixo de 50%.

O estabelecimento de um período de incubação aumentu
ou, significativamente, a sensibilidade do método, permitindo de
terminações precisas da atividade anticomplementar mesmo com redu
zidas concentrações das substâncias ensaiadas. Como exemplo, pode-
-se observar que as dosagens da FAV tiveram tempo de incubação de
60 minutos, o dobro do tempo para a GGHA e heparina. Quando a FAV,
nas concentrações relacionadas na Tabela III, era incubada com o
complemento por 30 minutos ou menos, os percentuais de inibição de
hemólise não atingiam 50%, o que dificultava a determinação da d_{50} .
O tempo de incubação deve, então, ser ajustado de acordo com as ca
racterísticas próprias de cada substância anticomplementar. Assim,
enquanto a GGHA e a FAV atuam progressivamente sobre o CH, de forma
que maior tempo de incubação resulta em detecção e dosagem de menor
quantidade destas substâncias (Figs. 12 e 14, págs. 45 e 47) a heparina
exerce sua atividade rapidamente, tornando desnecessário ou impro
dutivo estender-se este período (Fig. 13, pag. 46). Outros métodos
cinéticos de medida de atividade anticomplementar não utilizam a
incubação prévia à leitura da hemólise (Vargues, Moraud e Gonthier,
1964; Lauenstein, Siedentopf e Fischer, 1965) ou o fazem por
tempo muito curto (Doherty, 1981). O método proposto por Harkiss
e Brown, 1979 inclui um período de incubação de 30 minutos a 37°C
dos imunocomplexos precipitados pelo PEG com o complemento. Porém,

este último e os outros autores acima citados não entram em considerações a respeito da aplicação e vantagens do período de incubação.

A escolha do espectrofotômetro utilizado neste trabalho se deveu à sua simplicidade, fácil manuseio e baixo custo real e operacional, o que possibilita a utilização do método por maior número de laboratórios no país, que disponham de equipamento semelhante. Por outro lado as características descritas acima não implicam, de forma alguma, em prejuízo da precisão das medidas obtidas neste aparelho. As medidas de hemólise feitas em comprimento de onda 700 nm permitiram eliminar a influência da hemoglobina liberada. Estas leituras turbidimétricas, quando comparada às de liberação de hemoglobina, se mostraram mais precisas¹ e em acordo com trabalhos mais recentes de imuno-hemólise (Boackle e Pruitt, 1974; Lachmann, Hobart e Aston, 1973; Harkiss e Brown, 1979; Doherty, 1981). A sedimentação natural das hemácias em suspensão poderia ser causa de imprecisão nas leituras turbidimétricas. Entretanto, alguns pesquisadores concluíram que até 30 minutos esta sedimentação é insignificante (Siedentopf, Lauenstein e Fischer, 1965) e que a sua velocidade é de $7,4 \times 10^{-4}$ células por minuto, portanto desprezível em relação à velocidade de hemólise (Boackle e Pruitt, 1974). Neste trabalho, os tempos máximos de leitura de hemólise raramente excederam 15 a 17 minutos, o que nos autoriza a não considerar a sedimentação das hemácias como fator de imprecisão para o método.

Os métodos utilizados para medir atividade anticomplementar, estáticos ou cinéticos, devem proporcionar o cálculo de parâmetros específicos para cada substância testada. A determinação

1. Resultados não apresentados

destes parâmetros é que possibilita estabelecer comparações entre a atividade anticomplementar de várias substâncias, de uma mesma substância proveniente de vários lotes ou em diferentes estágios de purificação. Neste trabalho procuramos definir a d_{50} (quantidade da substância anticomplementar capaz de inibir 50% da atividade hemolítica do CH, nas condições padronizadas) e h (inclinação do segmento de reta obtido pela retificação ou não da relação cartesiana entre percentual de inibição, em ordenadas, e quantidade da substância anticomplementar, em abcissas). Os parâmetros d_{50} e h são calculados com o tratamento matemático das curvas obtidas nos experimentos. Sobre este aspecto é muito importante ressaltar que nossos resultados expressam diferentes relações entre y (percentual de inibição da atividade hemolítica) e x (quantidade de substância anticomplementar), para as três substâncias testadas. Os perfis gráficos das projeções lineares para a GGHA, FAV e heparina evidenciam as diferenças entre estas substâncias (Figs. 3, 4 e 5, págs. 22, 23 e 24). Portanto o trabalho matemático para a retificação destas curvas deve ser diferente. E, na verdade, verificamos que a projeção linear para GGHA (Fig. 3, pag. 22) já apresenta um segmento de reta como resultante, com um ajuste ótimo ($r^2 = 0,99$). Isto significa que as relações entre x e y , para a GGHA, podem ser escritas como a equação de uma reta, ou seja $y = h x + k$. Nos casos da heparina e FAV o mesmo não acontece. Os perfis obtidos nas mesmas circunstâncias representam curvas potenciais. As relações entre x e y passam a ser do tipo $y = k x^h$. Estas equações quando tratadas por logaritmos se tornam do tipo da equação da reta: $\log y = \log k + h \log x$ e, assim, as curvas potenciais são retificadas. Todavia no caso da heparina a relação é mais complexa. O simples tratamento por logaritmos não é suficiente para sua retificação. No trabalho de Walton,

Ellis e Taylor, 1957 é apresentada uma solução para retificar a curva, sigmoide no caso, obtida da medida da atividade anticomplementar, que é a aplicação da fórmula de probitos aos percentuais de inibição e logarítmos às quantidades de heparina. Embora os autores tenham utilizado método estático de fixação de complemento a transposição desta solução aos nossos resultados não constituiu problema. Ainda que a relação *probita versus log* fosse adequada, preferimos substituir probito por logito, em acordo com o proposto e defendido por Berksson, 1944 e 1951. Assim, para a heparina a relação retificada se tornou logito $Y = \log k + h \log x$, onde logito Y é igual a $\log y/1-y$. Por outro lado, analisando os valores de h obtidos das regressões *logito versus log*, em todos os ensaios com heparina, verificamos que estes são sempre aproximadamente 1,0. Desta maneira a relação entre x e y para a heparina pode ser expressa por uma equação linear do tipo $y/1-y = k + hx$. De fato, as projeções de $y/1-y$ em ordenadas e x em abcissas definem retas de ótimo coeficientes de correlação (Fig. 17, pag. 52). Portanto no caso particular da heparina, quer o tratamento logístico quer sua expressão não logarítmica são satisfatórios para retificação das curvas e cálculo da d_{50} e h. Para a FAV a retificação é possível com o tratamento logarítmico simples e a equação final é a descrita anteriormente, ou seja, $\log y = \log k + h \log x$.

Mentz von Krogh em trabalho de 1916 propôs uma fórmula matemática aplicável aos fenômenos, por ele denominados, reações de alternância. A hemólise é considerada como exemplo de reação de alternância e a equação de Mentz von Krogh é perfeitamente ajustável às relações entre hemólise e complemento. Expressões derivadas da equação de von Krogh são aplicáveis, da mesma maneira, à cinética de hemólise pelo complemento (Almeida, 1949 e 1950; Plescia,

Amiraian e Heidelberger, 1956; Pruitt, Turner e Boackle, 1974; Polhill, Pruitt e Johnston, 1978). Se considerarmos que a quantidade de substância anticomplementar exprime, em última análise, o complemento restante em cada tubo após o período de incubação e que o percentual de inibição da atividade hemolítica é derivado do tempo para 50% de hemólise, então as relações cinéticas da imuno-hemólise estudadas neste trabalho se aproximam daquelas em que a equação de von Krogh é aplicável. Entretanto estas considerações são adequadas apenas aos experimentos com a heparina. Isto possivelmente se deve aos diferentes mecanismos de ação destas substâncias sobre o complemento. Enquanto a heparina exerce sua ação rapidamente e independe do prolongamento do tempo de incubação, a GGHA e a FAV, de forma semelhante entre si, aumentam suas ações com o correr do tempo (Figs. 12, 13 e 14; pags. 45, 46 e 47). Desta forma, no período de leitura da hemólise que também é feito a 37°C e demanda tempo, o CH estará agindo sobre o sistema indicador sem sofrer a ação da heparina, que já se fez no período de incubação. Assim o percentual de inibição calculado para cada quantidade de heparina será sempre o correspondente ao complemento residual, estabelecido já no período de incubação. Para a GGHA e FAV tal não ocorre. Durante o período de leitura o CH está, ainda, sob a ação anticomplementar, uma vez que estas substâncias atuam continuamente. Por conseguinte, cada percentual de inibição será correspondente ao complemento residual, resultante da somatória da atividade anticomplementar ocorrida durante o período de incubação e o de leitura. Esta maior complexidade na geração de cada ponto representativo dos percentuais de inibição, poderia explicar o desajuste às relações de von Krogh para a GGHA e FAV.

As diferentes formas de atuação destas substâncias decorrem, com certeza, do mecanismo de interação com o sistema complemento. A GGHA é classicamente comparada aos imunocomplexos no que diz respeito à atividade anticomplementar. Sua ação se faz pela via clássica, a partir da ativação do complexo C_1 (Augener, Cooper e Müller-Eberhard, 1971), desencadeando a sequência até os últimos componentes. A FAV afeta a via clássica de ativação do complemento, aparentemente, interagindo com C_1 e C_4 . O mecanismo deste processo é objeto de estudos atualmente (Assis, 1982). Desta forma, ambas agem progressivamente sobre o complemento, ativando-o. A heparina, como outros polianions, inibe C_1 atuando diretamente na unidade C_{1q} (Raepple, Hill e Loos, 1976); impede a reação de C_2 e C_{4b} , num processo que sugere sequestro de íons Mg^{++} (Loos, Volanakis e Stroud, 1976 a); inibe o consumo de C_4 e C_2 pelo C_{1s} , provavelmente interagindo com os sítios combinatórios de carga positiva (Loos, Volanakis e Stroud, 1976 b). Destas informações e baseados em nossos resultados que mostram a atuação da heparina independentemente do tempo de incubação, podemos concluir que sua ação sobre o complemento é inibitória e não de ativação.

A partir das considerações acima, julgamos adequado que um método que se proponha medir atividade anticomplementar não pode ter sua aplicação e análise generalizadas a várias substâncias. É necessário que o estudo se faça para cada substância individualmente ou, pelo menos, para grupos afins, evitando o estabelecimento de regras ou formulações matemáticas muito abrangentes. Ainda com base nesta argumentação, poderíamos admitir que o método aqui proposto permite inferir sobre o modo de ação de substâncias anticomplementares, pela comparação com padrões bem estabelecidos como a GGHA e a heparina. De fato este expediente foi utilizado na investigação do mecanismo de ação da FAV sobre o complemento (Assis, 1982).

As outras substâncias testadas neste trabalho, a endotoxina de *E. coli* e o Zymosan, não apresentaram atividade anticomplementar mensurável quando ensaiadas pelo método na sua forma padronizada. Estas substâncias atuam, preferentemente na via alternativa do complemento (Marcus, Shin e Mayer, 1971; Brade et al., 1973). A quantidade de complemento utilizada no método é pequena (correspondente ao soro diluído 12 a 15 vezes) o que torna menos provável a detecção da atividade de substâncias que agem sobre a via alternativa (existente em baixa concentração no soro). Quando, nos experimentos 5.1 e 5.2, as incubações da endotoxina e do Zymosan se fizeram com soro concentrado e posteriormente diluído até 20 UCH₅₀, a atividade anticomplementar pode ser apreciada, porém não medida em termos de d₅₀. Podemos então concluir que o método, como padronizado, se presta a detectar e medir a ação de substâncias que agem na via clássica do complemento. Em contrapartida, substâncias com atividade observável nas condições do método, possivelmente atuam sobre a via clássica. Como corolário, para substâncias que não exibem atividade anticomplementar nestas condições, ainda permanece a possibilidade de que afetem o complemento, porém pela via alternativa.

O método foi submetido a um rigoroso controle de qualidade (exp. 4, pag.28). A reprodutibilidade se mostrou fator de excelência, expressa pela análise de variância não significativa quando aplicado aos ensaios em quintuplicata, para a GGHA e heparina.

Os experimentos realizados com a intenção de verificar a influência do número de unidades de complemento na determinação da d₅₀ mostraram, tanto para a GGHA quanto para a heparina, importante variação desta d₅₀ em função do número de UCH₅₀ (Tabs.

XIV e XV, Figs. 15 e 17; págs. 48 e 49 e 50 e 52). Estes resultados confirmam e ampliam os de Lauenstein, Siedentopf e Fischer de 1965, embora com valores absolutos diferentes para as d_{50} . Além da d_{50} , também as inclinações (h) dos segmentos de reta obtidos das projeções lineares de y versus x para a GGHA e $y/1-y$ versus x para a heparina variaram de acordo com o número de UCH_{50} . Levando em conta a ampla variação de atividade hemolítica, em unidades CH_{50} , entre as várias amostras ou lotes de complemento¹ e os nossos resultados discutidos acima, consideramos que a fixação de um número definido de UCH_{50} para cada experimento é condição básica para se assegurar a reprodutibilidade do método e para se estabelecer comparações entre diversos trabalhos. Walton, Ellis e Taylor, 1957, quando testaram a heparina com 5 amostras de soro de cobaia, cada uma proveniente de um animal diferente, encontraram significativas variações para d_{50} (IC_{50} para os autores), sem entretanto as correlacionar com as diferenças entre os números de unidades CH_{50} de cada amostra. Ainda analisando os resultados dos experimentos com variação do número de UCH_{50} , verificamos que as formas básicas das curvas, estabelecidas para 20 UCH_{50} , se repetem nos ensaios com 10, 30, 40 e 50 UCH_{50} . Portanto o comportamento das substâncias frente ao complemento não é alterado. Com o tratamento matemático destas relações, constatamos que existe correlação entre d_{50} e o número de unidades CH_{50} utilizado para determiná-las (Figs. 18 e 19). Esta correlação tem significado especial porque possibilita comparações entre dosagens efetuadas com diferentes quantidades de complemento. Outra verificação importante é a de que utilizando um número menor de unidades

1. Na espécie humana a faixa de normalidade para o complemento é de 200 a 400 UCH_{50} por ml de soro (Almeida, comunicação pessoal).

de complemento temos a possibilidade de detectar e medir menores quantidades de substância anticomplementar. Esta conclusão é corroborada pelos ensaios com a FAV, onde a utilização de 10 UCH₅₀ em vez de 20 UCH₅₀ como nos casos da GGHA e heparina, permitiu a determinação da d₅₀. Este recurso, ao lado da variação do tempo de incubação para algumas substâncias, proporciona maior sensibilidade ao método.

Finalmente, podemos verificar que há diferença de atividade hemolítica entre o soro humano reconstituído e preservado pela SPR e o mesmo soro não preservado. A atividade do soro em SPR é sempre maior que a do soro com SPR, mas ainda assim esta atividade aumenta paralelamente até a concentração correspondente a 25 UCH₅₀. Daí em diante, enquanto o soro sem SPR é mais ativo quando mais concentrado, o soro com SPR passa a ter esta ação prejudicada. Isto se deve à ação da SPR que também tem sua concentração aumentada, de tal forma que a solução atingindo condutividade em torno de 21 a 22 mS torna o meio inadequado à atividade do complemento. Esta interferência foi também notada nos experimentos com endotoxina e Zymosan, feitos com soro reconstituído e não diluído inicialmente, onde nos ensaios realizados com soro contendo SPR a atividade de anticomplementar não foi detectada. Estes resultados eram previsíveis pois a atividade hemolítica do complemento varia inversamente com a força do diluente (Mayer, 1961). Portanto a utilização de soro humano preservado pela SPR como fonte de complemento, em concentrações acima de 25 UCH₅₀, deve ser considerada com cuidado.

V - SUMÁRIO E

CONCLUSÕES

O trabalho aqui apresentado constituiu na padronização de um método para medida de atividade anticomplementar. Utilizou-se técnica cinética de fixação de complemento. Foram estudadas substâncias anticomplementares de atividade conhecida, como a gama globulina humana agregada pelo calor, heparina, endotoxina e zymosan além de uma fração ativa de veneno de sapo de ação sobre o complemento não totalmente esclarecida.

O método como padronizado permitiu a determinação de parâmetros específicos e definidos que caracterizaram as substâncias atuantes preferentemente sobre a via clássica do complemento (gama globulina humana agregada, heparina e fração do veneno de sapo), porém não aplicado para aquelas que agem sobre a via alternativa (endotoxina e zymosan). As análises gráficas e matemáticas das relações entre quantidades de substâncias anticomplementar e porcentagens de inibição da atividade hemolítica do complemento, evidenciaram diferenças entre as substâncias testadas, possibilitando inferências sobre o mecanismo de interação com o complemento.

As medidas feitas com quantidades variáveis de complemento ressaltaram a importância de se fixar um número definido de unidades hemolíticas em cada ensaio para torná-lo reprodutivo e comparável. Além disso foi possível demonstrar que há relação entre a dose para 50% de inibição da atividade do complemento e o número de unidades hemolíticas utilizado para sua medida.

Desde que o emprego de solução preservadora de complemento poderia afetar a atividade hemolítica foram definidas as condições experimentais que permitem o uso de complemento preservado com solução de Richardson.

O método padronizado se revelou de execução simples, não dispendioso, sensível e reprodutivo, capaz de detectar e medir a atividade de substâncias que interagem com o complemento, pela via clássica.

VI - SUMMARY

The present investigation concerns the standardization of a method for measuring anticomplement activity using kinetic techniques of complement fixation. Anticomplement substances of known activity were studied, such as heat-aggregated human gamma globulin, heparin, endotoxin and zymosan, as well as an active fraction of toad venom whose action on complement has not yet been fully elucidated.

Standardization of the method permitted the determination of specific and defined parameters that characterize the substances which act preferentially on the classic complement pathway (aggregated human gamma globulin, heparin, and the toad venom fraction). The method, however, could not be applied to substances that act on the alternative pathway (endotoxin and zymosan). Mathematical and graphic analysis of the relationship between amount of anticomplement substance and percentage of inhibition of the hemolytic activity of complement showed differences between the substances tested, which permitted inferences on their mechanism of action on complement.

Measurements carried out with varying amounts of complement showed the importance of fixing a defined number of hemolytic units in each assay for reproducibility and comparison purposes. In addition, it was possible to demonstrate a relationship between the dose needed for 50% inhibition of complement activity and the number of hemolytic units used for measurement.

Since the use of complement preserving solutions may affect the hemolytic activity, we defined experimental conditions that permit the use of complement preserved in Richardson solution.

The method standardized here was shown to be easy to carry out, inexpensive, sensitive and reproducible, and able to measure the activity of substances that interact with complement through the classic pathway.

V I I - R E F E R Ê N C I A S

B I B L I O G R Á F I C A S

- ALMEIDA, J.O. (1941). A alternância nas reações de Hemólise. Acta Médica vol. 8, 6: 289.
- ALMEIDA, J.O. (1949). O tempo de hemólise nas reações de fixação do complemento. Rev. Brasil. Biol., 9(3): 249.
- ALMEIDA, J.O. (1950). Contribuição para o estudo das reações quantitativas de fixação do complemento. Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
- ALMEIDA, J.O. and FIFE Jr., E.H. (1976). Quantitatively standardized Complement Fixation Methods for critical evaluation of antigens prepared from *Trypanosoma cruzi*. Pan. Am. Health. Org. Scientific Publications, 319: 41.
- ASSIS, ANA I. (1982). Atividade anticomplementar de uma fração do veneno da glândula paratóide de *Bufo marinus paracnemis* Lutz. Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
- AUGENER, W., GREY, H.M., COOPER, N.R. and MÜLLER-EBERHARD, H.J. (1971). The reaction of monomeric and aggregated immunoglobulins with C1. Immunochemistry, 8: 1.
- BERKSON, J. (1944). Application of the logistic function to bio-assay. J. American Statistical Association 39: 357.

BERKSON, J. (1951). Why I prefer logits to probits. *Biometrics* 7: 327.

BOACKLE, R.J. and PRUITT, K.M. (1974). A convenient method for the study of anticomplementary substances in biological fluids. *Protides of the Biological fluids.*, 21: 613 (ed. by H. Peeters) Pergamon Press, Oxford.

BRADY, V., LEE, G.D., NICHOLSON, A., SHIN, H.S. and MAYER, M.M. (1973). The reaction of zymosan with the properdin system in normal and C4-deficient guinea pig serum. *J. Immunol.* 111(5): 1389.

DIXON, F.J., VASQUEZ, J.J. WEIGLE, W.O. et al. (1958). Pathogenesis of serum sickness. *Arch. Pathol.* 65: 18.

DIXON, F.J., FELDEMAN, J.D. and VASQUES, J.J. (1961). Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 113: 899.

DOHERTY, N.S. (1981). Complement-inhibiting and anti-inflammatory properties of chlorazole fast pink 2BL. *Clin. exp. Immunol.* 43: 260.

GERMUTH, F.G. Jr. (1957). A comparative histologic and immunologic study in rabbits of induced hypersensitivity of the serum sickness type. *J. Exp. Med.* 97: 257.

- GERMUTH, F.G.; FLANAGAN, C. and MONTENEGRO, M.R. (1957). The relationships between the chemical nature of the antigen, antigen dosage, rate of antibody synthesis, and the occurrence of arteritis and glomerulonephritis in experimental hypersensitivity. *Johns Hopkins Med J* 101: 149.
- GERMUTH, F.G. and MCKINNON, G.E. (1957). Studies on the biological properties of antigen-antibody complexes. I. Anaphylactic shock induced by soluble antigen-antibody complexes in unsensitized normal guinea pigs. *Johns Hopkins Med J* 101: 13.
- HARKISS, G.D. and BROWN, D.L. (1979). Detection of immune complexes by a new assay, the polyethylene glycol precipitation-complement consumption test (PEG-CC). *Clin. exp. Immunol.* 36: 117.
- ISHIZAKA, T., ISHIZAKA, K., SALMON, S. and FUDENBERG, H. (1967). Biological activities of aggregated γ -globulin. VIII. Aggregated immunoglobulins of different classes. *J. Immunol.* 99: 82.
- JONES, B.M. (1979). The quantitation of alternative pathway complement function by timed lysis assay. *J. Immunol. Methods*, 29: 287.
- KLEIN, M. and SIMINOVITCH, K. (1981). The significance and limitations of current methods for detecting circulating immune complexes. *J. Rheumatology* 8: 2.

- LACHMANN, P.L.J., HOBART, M. and ASTON, W.P. (1973). Complement Technology. Handbook of experimental Immunology (ed. by D.M. Weir) 2nd. Edn. Chap. 5 Blackwell, Oxford.
- LAUENSTEIN, K., SIEDENTOPF, H.G. and FISCHER, H. (1965). Über die Wirkung von heparin, heparinoiden und carrageenin auf die Komponenten des meerschweinchen-komplements in vitro. Z. Naturforschg. 20b, 575.
- LOOS, M., VOLANAKIS, J.E. and STROUD, R.M. (1976). Mode of interaction of different polyanions with the first (C1, C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement - II. Immunochemistry, 13: 257.
- LOOS, M., VOLANAKIS, J.E. and STROUD, R.M. (1976). Mode of interaction of different polyanions with the first (C1, C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement. III. Immunochemistry 13: 789.
- MARCUS, R.L. SHIN, H.S. and MAYER, M.M. (1971). An alternate complement pathway: C-3 cleaving activity, not due to C4, 2a, on endotoxic lipopolysaccharide after treatment with Guinea Pig Serum; relation to preperdin. Proc. Nat. Aca. Sci. USA 68(6): 1351.
- MAYER, M.M. (1961). Complement and complement fixation. Experimental Immunochemistry (ed. by Kabat, E.A. and Mayer, M. M.) Chap. 4, 2nd Ed. Charles C. Thomas, Springfield.

MERGENHAGEN, S.E., SNYDERMAN, R. and PHILIPS, J.K. (1973).

Activation of complement by endotoxin. *J. Infec. Dis.* 128: S86.

NIELSEN, H. and SEVEHAG, S.E. (1976). Detection and differentiation of immune complexes and IgG aggregates by a complement consumption assay. *Acta path. Microbiol. Scand. Sect. C*, 84: 261.

NIELSEN, H. (1980). Circulating immune complexes: properties, methods for detection and disease models. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. (Suppl.)* 273: 1

OMS (1977). Informe de un grupo científico. Acción patógena de los complejos inmunitarios. Serie de Informes Técnicos, nº 606, Ginebra.

PLESCIA, O.J., AMIRAIAN, K. and HEILDELBERGER, M. (1956). A Kinetic method for the titration of complement. *Arch. of Biochemistry and Biophysics* vol. 62 nº 2: 346.

POLHIL Jr., R.B., PRUITT, K.M. and JOHNSTON Jr, R.B. (1978). Kinetic assessment of alternative complement pathway activity in a hemolytic system. I. Experimental and mathematical analysis. *J. Immunol.* 121: 363.

PRUITT, K.M., TURNER, M.E. and BOACLE, R.J. (1974). A Kinetic model for the quantitative analysis of complement. *J. theor. Biol.* 44: 207.

- RAEPPLE, E., HILL, H.U. and LOOS, M. (1976). Mode of interaction of different polyanions with the first (C1, C1), the second (C2) and the fourth (C4) component of complement. I. *Immunochemistry* 13: 251.
- RENT, R., ERTEL, N., EISENSTEIN, R. and GEWURZ, H. (1975). Complement activations by interaction of polyanions and polycations. I. Heparin-Protamine induced consumptions of complement. *J. Immunol.* 114(1): 120.
- ROTH, K.L. (1965). Notes on the relationship between the therapeutic and anticomplementary effects of heparin in acquired hemolytic anemia. *Ann. Allergy* 23: 83.
- SIEDENTOPF, H.G., LAUENSTEIN, K. and FISCHER, H. (1965). Über die automatische registrierung der Hämolyse durch serumkomplement und lysolecithin. *Z. Naturforschg.* 20b, 569.
- SOLTIS, R.D., HASZ, D., MORRIS, M.J. and WILSON, I.D. (1979). The effect of heat inactivation of serum on aggregation of immunoglobulins. *Immunol.* 36: 37.
- SOOTHILL, J.F. (1977). Chairman's summary. Detection and measurement of circulating soluble antigen-antibody complexes. *Ann. rheum. Dis.* 36, Suppl. 1: 64.

THEOFILOPOULOS, A.N. (1980). Evaluation and clinical significances of circulating immune complexes. Progress in Clinical Immunology (ed. by R.S. Schwartz) vol. 4 chap. 3, Grune & Stratton, Inc. New York.

ULRICH, C.A. and MAC ARTHUR, F.X. (1942). An improved method for the production of anti-sheep hemolysin. Am. J. Clin. Path. Tech. Suppl., 12: 84.

VARGUES, R., MORAUD, B. and GONTHIER, F. (1964). Etude cinétique de l'inactivation du complément immunologique C' par les γ -globulines humaines agrégées. C.R. Soc. Biol. 158: 1736.

von KROGH, M. (1916). Colloidal chemistry and immunology. J. infect. Dis. 19: 452.

von PIRQUET, C.L. (1911). Allergy. Arch. Intern. Med. 7: 259.

WALTON, K.W., ELLIS, H.A. and TAYLOR, C.E.D. (1957). A method for the determination of the anticomplementary of heparin and related compound. J. Exp. Pathology 38(3): 237.

WISING, P.J. (1937). The complement-fixing properties of heparin salts. Acta Medica Scandinavica XCI (VI).