

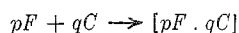
## Naturaleza de la reacción de fijación de complemento

### III. - Velocidad de reacción

Por R. R. de PIROSKY, I. PIROSKY y S. de YALOV

El estudio cuantitativo de los cambios que se producen cuando se ponen en contacto antígeno, anticuerpo y complemento, indica que, si se tiene en cuenta el equilibrio final del sistema, la afinidad del complejo fijador por el complemento está determinada por la relación antígeno anticuerpo. El análisis de este proceso realizado en (1) y (2) demuestra que la combinación complejo fijador-complemento corresponde al tipo de las reacciones químicas, por su coeficiente de temperatura positivo, la influencia de la concentración sobre la velocidad con que el sistema llega al equilibrio y porque la adición fraccionada de los reactivos permite llegar al mismo estado final prolongando sólo el tiempo de reacción.

La reacción entre complejo fijador y complemento puede representarse estequiométricamente,



indicando  $C$  el complemento y  $F$  el complejo fijador, siendo

$$F = [A_x G_y]$$

El valor de  $q$  depende de la variación de  $x$  e  $y$ ; en efecto, ya se varíe  $x$  manteniendo  $y$  constante, o a la inversa, se obtienen en ambos casos mezclas con diferente afinidad para el complemento, cuyo conjunto constituye una zona de fijación dentro de la cual aparece una relación particular de  $x$  a  $y$  que hemos denominado óptima por el hecho de que fija la mayor cantidad de complemento. Pero si esta misma cantidad  $G_y$  de antígeno se sensibiliza con anticuerpo proveniente de diferentes sueros, se constituyen complejos fijadores óptimos que fijan cantidades de complemento variables de suero a suero (ver en (1), tablas I y II).

El examen de los aspectos cuantitativos de esta reacción, que nos ha llevado a fijar las relaciones estequiométricas arriba mencionadas, se realizó sobre la base de los valores obtenidos cuando el sistema llega al equilibrio y siendo éste la resultante de los múltiples factores que intervienen en una reacción en fase heterogénea entre sustancias de peso molecular tan elevado — en donde la velocidad de difusión de los componentes y de los productos resultantes de ésta no se pueden dejar de tener en cuenta — hemos considerado que para penetrar en el verdadero mecanismo que rige el neto fenómeno de la combinación de estos reactivos era necesario realizar el estudio de la velocidad de esta reacción y sobre todo de la influencia de la variación de la concentración inicial sobre dicha velocidad. Para ello fué necesario establecer, *A*, la progresión del desgaste del complemento en función del tiempo y *B* la influencia de la concentración inicial de los reactivos sobre el tiempo de transformación de una fracción dada de los mismos.

#### MATERIAL

*Antígeno.* Complejo glúcido lípido separado de bacterias del género *Brucella* tipo suis, cepa 305, según técnica de Boivin y Mesrobeanu.

*Anticuerpo.* — Sueros humanos de brucelosos en actividad o convalescentes, producidos por coagulación espontánea de la sangre, inactivados a 56°C durante 30 minutos y seleccionados considerando su alto título en anticuerpo fijador de complemento (\*).

*Complejo fijador óptimo.* — Se prepara en un tubo de ensayo la cantidad total de complejo a emplear en los experimentos del día, haciendo una mezcla de antígeno y suero en proporciones óptimas y en concentraciones tales de modo que las dosis necesarias estén contenidas en 0,2 c.c. Esta mezcla se deja a la temperatura de laboratorio (25°C) durante una hora.

*Complemento.* — Sangre de cavia obtenida por punción de corazón, dejada una hora en cámara fría y otra a 37°C para su coagulación. Se mezcla el suero obtenido de la sangre de seis cavias. La mezcla se diluye al décimo con solución de NaCl al 0,9 % y

(\*) Agradecemos al Dr. E. A. Molinelli, jefe de la sección Estudios Epidemiológicos del Instituto, el habernos facilitado los sueros utilizados en estas experiencias.

se la mantiene en cámara fría a 0°-2°C. Se determina la dosis hemolítica mínima (d.h.m.) frente a la mayor concentración de antígeno a ser utilizada en la reacción. Todos los sistemas comparados entre sí son realizados en el día con la misma solución de complemento.

*Sistema hemolítico.* — Glóbulos de carnero sensibilizados de manera que 0,5 c.c. de la mezcla hemolítica contienen 5 unidades de amboceptor y glóbulos rojos al 5%. Este indicador se sensibiliza durante cinco minutos a 37°C en baño de agua.

*Método.* — Los experimentos descritos en los párrafos A) y B) se realizaron de acuerdo a la técnica siguiente: En una serie de tubos se distribuyen cantidades crecientes de complemento, se llevan a volumen (máximo del experimento) con solución fisiológica y se agrega 0,2 c.c. de complejo fijador. Se dejan los sistemas en baño de agua a 37°C y al cabo de tiempos diferentes que varían entre 5 y 180 minutos se interrumpe la reacción por el agregado de 0,5 c.c. de la mezcla hemolítica. De este modo, cada serie de tubos que recibe la mezcla hemolítica representa muestras de la reacción tomadas a tiempos diferentes. Después de 30 minutos de haber agregado el indicador se hace la lectura, tomando como índice del límite de fijación la aparición de hemolisis.

La d.h.m. de complemento determinada previamente, se corrige para cada sistema frente a la dosis máxima de antígeno y de suero separadamente. Cada una de las series empleadas para la corrección de la d.h.m. se realizan en el volumen máximo y permanecen a la misma temperatura y tiempo que el sistema para el cual se aplica la corrección.

## RESULTADOS

A) *Desgaste del complemento en función del tiempo.* — En la tabla I se transcribe el protocolo N° 31 en el cual se ha seguido la progresión de desgaste del complemento por un mismo complejo fijador en tiempos que varían entre 5 y 180 minutos. Para ello, dado que en las condiciones experimentales anotadas sólo puede dosarse el exceso de complemento correspondiente a la variación comprendida entre poca hemólisis y hemólisis completa, fué menester disponer una serie de sistemas cuyos tubos contienen en 0,2 c.c. de complejo fijador, 3,12 gamas de antígeno y 0,01 c.c. de suero. Se constituyeron tantos sistemas como tiempos se irían a considerar,

TABLA I. — *Desgaste del complemento en función del tiempo*

En esta tabla se indica en cada división las cantidades de complemento utilizadas, tiempo de contacto y los resultados de la lectura de la hemólisis

| Protocolo N° 31  |                             | Complejo fijador en 0,2 cc. { 0,01 cc. de suero<br>3,12 gamas de antígeno |           |                           |                             |   |           |   |                             |                     |                             |             |                             |             |          |      |  |
|--|-----------------------------|---|-----------|---------------------------|-----------------------------|---|-----------|---|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|----------|------|--|
| Suero: L. C.   |                             | Tiempo de contacto (en minutos)   |           |                           |                             |   |           |   |                             |                     |                             |             |                             |             |          |      |  |
|  |                             | 5   |           | 10                        |                             | 20  |           | 30  |                             | 40                  |                             | 60          |                             | 120         |          | 180  |  |
| Complemento<br><sup>1</sup> / <sub>10</sub> cc.          | Hemólisis                   |   |           |                           |                             |   |           |   |                             |                     |                             |             |                             |             |          |      |  |
| 1,00   | 0                           | 1,00  | 0         | 1,60                      | 0                           | 1,70  | 0         | 1,90  | 0                           | 2,10                | 0                           | 2,30        | 0                           | 2,40        | 0        |      |  |
| 1,10   | 0                           | 1,10  | 0         | 1,70                      | 0                           | 1,80  | 0         | 2,00  | 0                           | 2,20                | 0                           | 2,40        | 0                           | 2,50        | 0        |      |  |
| <b>1,20</b>  | <b>0</b>                    | 1,20  | 0         | <b>1,80</b>               | <b>pH</b>                   | 1,90  | 0         | <b>2,10</b>                                     | <b>pH</b>                   | <b>2,30</b>         | <b>0</b>                    | 2,50        | 0                           | 2,60        | 0        |      |  |
| 1,30   | <sup>1</sup> / <sub>2</sub> | 1,30  | 0         | 1,90                      | <sup>3</sup> / <sub>4</sub> | <b>2,00</b>                                     | <b>pH</b> | 2,20  | <sup>1</sup> / <sub>2</sub> | 2,40                | <sup>1</sup> / <sub>2</sub> | <b>2,60</b> | <b>pH</b>                   | <b>2,70</b> | <b>0</b> |      |  |
| 1,40   | H                           | <b>1,40</b>   | <b>pH</b> | 2,00                      | H                           | 2,10  | CH        | 2,30  | H                           | 2,50                | H                           | 2,70        | <sup>3</sup> / <sub>4</sub> | 2,80        | CH       |      |  |
| 1,50   | H                           | 1,50  | H         |                           |                             |   |           |   |                             |                     |                             |             |                             |             |          |      |  |
| Valor de d. h. m. en cc. en los diferentes tiempos ..... |                             |   |           | 0,12                      |                             | 0,12  |           | 0,12  |                             | 0,12                |                             | 0,12        |                             | 0,13        |          | 0,14 |  |
|  |                             |   |           | 0 = ausencia de hemólisis |                             | <sup>1</sup> / <sub>2</sub> = 50 % de hemólisis |           | <sup>3</sup> / <sub>4</sub> = 75 % de hemólisis |                             | CH = casi hemólisis |                             |             |                             |             |          |      |  |
|  |                             |   |           | pH = poca hemólisis       |                             |   |           |   |                             |                     |                             |             |                             |             |          |      |  |

TABLA I a. — *Desgaste del complemento en función del tiempo*

En esta tabla se anota el mismo experimento que en la tabla I, con los reactivos diluidos al <sup>1</sup>/<sub>2</sub>.

| Protocolo N° 31.   |           | Complejo fijador en 0,2 cc. { 0,005 cc. de suero<br>1,56 gamas de antígeno |                             |             |                             |             |                             |             |           |             |           |             |                             |             |                             |      |  |
|--|-----------|--|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|-------------|-----------|-------------|-----------|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|------|--|
| Suero: L. C.   |           | Tiempo de contacto (en minutos)  |                             |             |                             |             |                             |             |           |             |           |             |                             |             |                             |      |  |
|  |           | 5  |                             | 10          |                             | 20          |                             | 30          |           | 40          |           | 60          |                             | 120         |                             | 180  |  |
| Complemento<br><sup>1</sup> / <sub>10</sub> cc.          | Hemólisis |  |                             |             |                             |             |                             |             |           |             |           |             |                             |             |                             |      |  |
| 0,30   | 0         | 0,30   | 0                           | 0,60        | 0                           | 0,70        | 0                           | 0,70        | 0         | 0,90        | 0         | 1,00        | 0                           | 1,00        | 0                           |      |  |
| 0,40   | 0         | 0,40   | 0                           | 0,70        | 0                           | 0,80        | 0                           | 0,80        | 0         | 1,00        | 0         | 1,10        | 0                           | 1,10        | 0                           |      |  |
| <b>0,50</b>  | <b>pH</b> | 0,50   | 0                           | <b>0,80</b> | <b>0</b>                    | <b>0,90</b> | <b>pH</b>                   | 0,90        | 0         | <b>1,10</b> | <b>pH</b> | <b>1,20</b> | <b>0</b>                    | 1,20        | 0                           |      |  |
| 0,60   | CH        | <b>0,60</b>  | <b>pH</b>                   | 0,90        | <sup>3</sup> / <sub>4</sub> | 1,00        | <sup>1</sup> / <sub>2</sub> | <b>1,00</b> | <b>pH</b> | 1,20        | H         | 1,30        | <sup>1</sup> / <sub>2</sub> | <b>1,30</b> | <b>0</b>                    |      |  |
| 0,70   | H         | 0,70   | <sup>3</sup> / <sub>4</sub> | 1,00        | H                           | 1,10        | H                           | 1,10        | H         | 1,30        | H         | 1,40        | H                           | 1,40        | <sup>1</sup> / <sub>2</sub> |      |  |
| Valor de d. h. m. en cc. en los diferentes tiempos ..... |           |  |                             | 0,12        |                             | 0,12        |                             | 0,12        |           | 0,12        |           | 0,12        |                             | 0,13        |                             | 0,14 |  |

agregando para cada tiempo cantidades de complemento que oscilaron alrededor del valor límite de saturación del complejo determinado previamente en forma aproximada. De este modo la concentración inicial del complejo fijador es igual en todos los tubos, presentando en cambio la del complemento una variación entre dos tiempos consecutivos, que oscila entre 5 y 28 %; esta última cifra se refiere a los tubos indicadores del límite de fijación. En estas condiciones y teniendo en cuenta la atenuación de la d.h.m. cuyo valor pasa de 0,12 a 0,14 c.c. en la duración máxima del experimento, las cantidades de sustancia activa de complemento fijado son las que se resumen en la tabla II.

TABLA II. — Resumen del protocolo N° 31. (Tabla I)

|   | Tiempo en minutos |      |      |      |      |      |      |        |      |
|---|-------------------|------|------|------|------|------|------|--------|------|
|   | 0                 | 5    | 10   | 20   | 30   | 40   | 60   | 120    | 180  |
| Cantidad absoluta de complemento fijado en c.c. . .     | —                 | 1,20 | 1,40 | 1,80 | 2,00 | 2,10 | 2,30 | 2,60   | 2,70 |
| Cantidad de complemento activo fijado en c.c. . . . . . | —                 | 1,20 | 1,40 | 1,80 | 2,00 | 2,10 | 2,30 | 2,40   | 2,40 |
| $\frac{\Delta x}{\Delta t}$ en c.c.                     |                   | 0,24 | 0,04 | 0,04 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,0016 | 0,0  |

Como puede verse para la concentración de los reactivos anotada, el 75 % (2 c.c.) (Tabla I) del complemento total (2,7 c.c.) que el complejo fijador gasta en el equilibrio, es fijado en los primeros 30 minutos de la reacción. Si por otra parte, consideramos la variación del incremento  $\frac{\Delta x}{\Delta t}$  de la cantidad de complemento que se desgasta en la unidad de tiempo a medida que se prolonga el contacto entre los reactivos, el valor  $\frac{\Delta x}{\Delta t}$  (tabla II) que es de 0,24 en los primeros 5 minutos, disminuye rápidamente (24 veces menor entre 40 y 60 minutos y 150 veces entre 60 y 120 minutos) para anularse después de las dos horas. En el gráfico 1, la pendiente de la tangente de la curva *a* evidencia que  $\frac{\Delta x}{\Delta t}$  notable en el comienzo de la reacción es prácticamente nula a los 60 minutos. La curva *b*, representación del mismo experimento anterior con una

concentración de reactivos disminuída al  $\frac{1}{2}$  (tabla I a y II a) ofrece características semejantes, pero con  $\frac{\Delta x}{\Delta t}$  menores.

TABLA IIa. — Resumen de la tabla Ia

|   | Tiempo en minutos |      |      |      |      |     |      |      |      |
|---|-------------------|------|------|------|------|-----|------|------|------|
|   | 0                 | 5    | 10   | 20   | 30   | 40  | 60   | 120  | 108  |
| Cantidad absoluta de complemento fijado en c.c. . .     | —                 | 0,50 | 0,60 | 0,80 | 0,90 | 1,0 | 1,10 | 1,25 | 1,35 |
| Cantidad de complemento activo fijado en c.c. . . . . . | —                 | 0,50 | 0,60 | 0,80 | 0,90 | 1,0 | 1,10 | 1,15 | 1,15 |
| $\frac{\Delta x}{\Delta t}$ en c.c.                     |                   |      |      |      |      |     |      |      |      |
|   |                   |      |      |      |      |     |      |      |      |

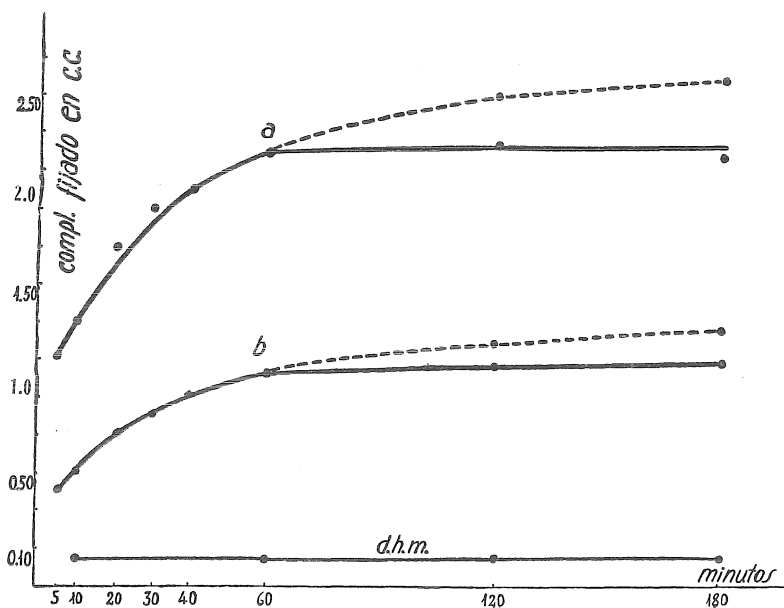


GRÁFICO N° 1. — Desgaste del complemento en función del tiempo.

Curva a: 3,12 gamas de antígeno y 0,01 cc. de suero.

Curva b: 1,56 gamas de antígeno y 0,005 cc. de suero.

Línea punteada: volumen de complemento que desaparece.

Línea llena: cantidad de sustancia activa fijada.

Ahora bien, a fin de hallar una expresión de la relación entre velocidad y concentración, hemos estudiado la reacción en los pri-

meros tiempos, buscando la relación entre concentración inicial de los reactivos y tiempo necesario para transformar una cantidad determinada de uno de ellos (el complemento)(\*).

*B) Influencia de la concentración inicial de los reactivos sobre el tiempo de transformación de una fracción dada de los mismos.* — Como hemos visto, de los elementos que integran el sistema que estudiamos conocemos únicamente la concentración absoluta del antígeno que constituye el complejo fijador; en cambio, de los demás componentes podemos obtener sólo los valores de sus concentraciones relativas. Para tener un punto de referencia en cuanto a la influencia de la variación de la concentración inicial sobre la velocidad, hemos modificado la concentración inicial de complejo fijador en un 50 %, variación ésta que corresponde también al complemento que entra en reacción, dado que por tratarse de un complejo fijador óptimo,  $C/F = K$  (1). Para establecer la relación entre el desgaste de una cantidad  $a$  de los reactivos y el tiempo, hemos determinado en qué tiempo una fracción del complemento es gastada cuando la concentración inicial del complejo fijador y complemento varían en un 50 %. Con este objeto hemos seguido la variación de la concentración del complemento en tiempos que oscilan entre 5 y 180 minutos frente a tres complejos fijadores óptimos cuya concentración inicial corresponde a 3,12, 1,56 y 0,78 gamas de antígeno y 0,04, 0,02 y 0,01 c.c. de suero respectivamente (Tablas III y IV y gráfico N° 2).

Si se observa el gráfico N° 2, representación de los valores de la tabla III se comprueba que en el sistema cuyo complejo fijador tiene una concentración inicial de 3,12 gamas de antígeno, en el cual se fija 1,53 c.c. de la solución de complemento en 180 minutos, 0,70 c.c. de ese mismo complemento son fijados en 5 minutos. En cambio, en el sistema cuya concentración inicial de complejo fijador es la mitad (1,56 gamas de antígeno) y en el cual entran en reacción 0,76 c.c. de complemento, el tiempo necesario para transformar 0,35 c.c. de complemento es de 12 minutos y son necesarios 22 minutos para transformar 0,175 c.c. de comple-

(\*) Téngase en cuenta que conocemos sólo la concentración inicial del complejo fijador y no su variación durante la marcha del proceso. Por otra parte no nos es posible determinar las modificaciones de la concentración del complemento en los diferentes tiempos.

TABLA III. — *Tiempo de transformación de una cantidad dada de complemento cuando la concentración inicial varía en un 50 %.*

| 5m.   |           | 10              | 20             | 30             | 40             | 60             | 120            | 180           |
|---|-----------|-----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|---------------|
| Complemento Hemólisis   |           |                 |                |                |                |                |                |               |
| 0,50  | 0         | 0,60 0          | 0,90 0         | 1,0 0          | 1,10 0         | 1,30 0         | 1,50 0         | <b>1,70 0</b> |
| 0,60  | 0         | 0,70 0          | 1,0 0          | 1,10 0         | 1,20 0         | 1,40 0         | 1,60 0         | 1,80 1/2      |
| <b>0,70</b>   | <b>pH</b> | 0,80 0          | <b>1,10 0</b>  | <b>1,20 pH</b> | <b>1,30 pH</b> | <b>1,50 pH</b> | <b>1,70 pH</b> | 1,90 H        |
| 0,80  | H         | <b>0,90 pH</b>  | 1,20 3/4       | 1,30 H         | 1,40 H         | 1,60 3/4       | 1,80 CH        | 2,0 H         |
| 0,90  | H         | 1,0 H           | 1,30 H         | 1,40 H         | 1,50 H         | 1,70 H         | 1,90 H         | 2,10 H        |
| Valor de la d.h.m.en c.c. en los diferentes tiempos                       |           | 0,10            | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,11           | 0,11          |
| Complejo fijador en 0,2 cc. { 0,04 de suero<br>3,12 gamas de antígeno     |           |                 |                |                |                |                |                |               |
| Complemento Hemólisis   |           |                 |                |                |                |                |                |               |
| 0,10  | 0         | 0,20 0          | 0,30 0         | 0,40 0         | 0,50 0         | 0,60 0         | <b>0,80 0</b>  | <b>0,80 0</b> |
| <b>0,20</b>   | <b>0</b>  | 0,30 0          | <b>0,40 0</b>  | <b>0,50 0</b>  | <b>0,60 0</b>  | <b>0,70 pH</b> | 0,90 3/4       | 0,90 1/2      |
| 0,30  | 1/2       | <b>0,40 1/4</b> | 0,50 1/2       | 0,60 1/2       | 0,70 3/4       | 0,80 CH        | 1,0 H          | 1,00 CH       |
| 0,40  | H         | 0,50 H          | 0,60 H         | 0,70 H         | 0,80 H         | 0,90 H         | 1,10 H         | 1,10 H        |
| 0,50  | H         | 0,60 H          | 0,70 H         | 0,80 H         | 0,90 H         | 1,0 H          | 1,20 H         | 1,20 H        |
| Valor de la d.h.m.en c.c. en los diferentes tiempos                       |           | 0,10            | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,11           | 0,11          |
| Complejo fijador en 0,2 cc. { 0,02 cc de suero<br>1,56 gamas de antígeno  |           |                 |                |                |                |                |                |               |
| Complemento Hemólisis   |           |                 |                |                |                |                |                |               |
| 0,10  | 1/2       | <b>0,10 0</b>   | 0,10 0         | 0,10 0         | 0,10 0         | 0,20 0         | 0,30 0         | 0,30 0        |
| 0,20  | H         | 0,20 3/4        | <b>0,20 pH</b> | <b>0,20 0</b>  | 0,20 0         | <b>0,30 0</b>  | <b>0,40 0</b>  | <b>0,40 0</b> |
| 0,30  | H         | 0,30 H          | 0,30 H         | 0,30 3/4       | <b>0,30 pH</b> | 0,40 3/4       | 0,50 3/4       | 0,50 1/2      |
| 0,40  | H         | 0,40 H          | 0,40 H         | 0,40 H         | 0,40 H         | 0,50 H         | 0,60 H         | 0,60 H        |
| Valor de la d.h.m.en c.c. en los diferentes tiempos                       |           | 0,10            | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,11           | 0,11          |
| Complejo fijador en 0,2 cc. { 0,01 cc. de suero<br>0,78 gamas de antígeno |           |                 |                |                |                |                |                |               |
| Complemento Hemólisis   |           |                 |                |                |                |                |                |               |
| 0,10  | 1/2       | <b>0,10 0</b>   | 0,10 0         | 0,10 0         | 0,10 0         | 0,20 0         | 0,30 0         | 0,30 0        |
| 0,20  | H         | 0,20 3/4        | <b>0,20 pH</b> | <b>0,20 0</b>  | 0,20 0         | <b>0,30 0</b>  | <b>0,40 0</b>  | <b>0,40 0</b> |
| 0,30  | H         | 0,30 H          | 0,30 H         | 0,30 3/4       | <b>0,30 pH</b> | 0,40 3/4       | 0,50 3/4       | 0,50 1/2      |
| 0,40  | H         | 0,40 H          | 0,40 H         | 0,40 H         | 0,40 H         | 0,50 H         | 0,60 H         | 0,60 H        |
| Valor de la d.h.m.en c.c. en los diferentes tiempos                       |           | 0,10            | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,10           | 0,11           | 0,11          |



TABLA IV (Resumen de la tabla III)

|                  |   | Tiempo en minutos  |   |      |      |      |      |      |      |      |      |
|------------------|---|--|---|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                  |   | 0  | 5 | 10   | 20   | 30   | 40   | 60   | 120  | 180  |      |
| Complejo fijador | { 0,04 cc. de suero<br>3,12 gamas de antígeno | Cantidad absoluta de complemento $1/10$ fijado en cc. .... | — | 0,70 | 0,90 | 1,10 | 1,20 | 1,30 | 1,50 | 1,70 | 1,75 |
|                  |   | Cantidad de complemento activo $1/10$ fijado en cc. ....   | — | 0,70 | 0,90 | 1,10 | 1,20 | 1,30 | 1,50 | 1,53 | 1,52 |
| Complejo fijador | { 0,02 cc. de suero<br>1,56 gamas de antígeno | Cantidad absoluta de complemento $1/10$ fijado en cc. .... | — | 0,25 | 0,40 | 0,45 | 0,50 | 0,60 | 0,70 | 0,80 | 0,85 |
|                  |   | Cantidad de complemento activo $1/10$ fijado en cc. ....   | — | 0,25 | 0,40 | 0,45 | 0,50 | 0,60 | 0,70 | 0,72 | 0,76 |
| Complejo fijador | { 0,01 cc. de suero<br>0,78 gamas de antígeno | Cantidad absoluta de complemento $1/10$ fijado en cc. .... | — | 0,05 | 0,10 | 0,20 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,40 | 0,45 |
|                  |   | Cantidad de complemento activo $1/10$ fijado en cc. ....   | — | 0,05 | 0,10 | 0,20 | 0,20 | 0,25 | 0,30 | 0,36 | 0,40 |

mento en el sistema que contiene 0,78 gamas de antígeno y cuyo gasto total de complemento es de 0,38 c.c. (\*).

Por lo que antecede y considerando los primeros tiempos de la reacción, según resalta en el gráfico N° 2, se observa que cuando la concentración inicial de los reactivos se reduce sucesivamente a la mitad, el tiempo necesario para el desgaste de una cantidad determinada de complemento se duplica. Si bien la técnica utilizada

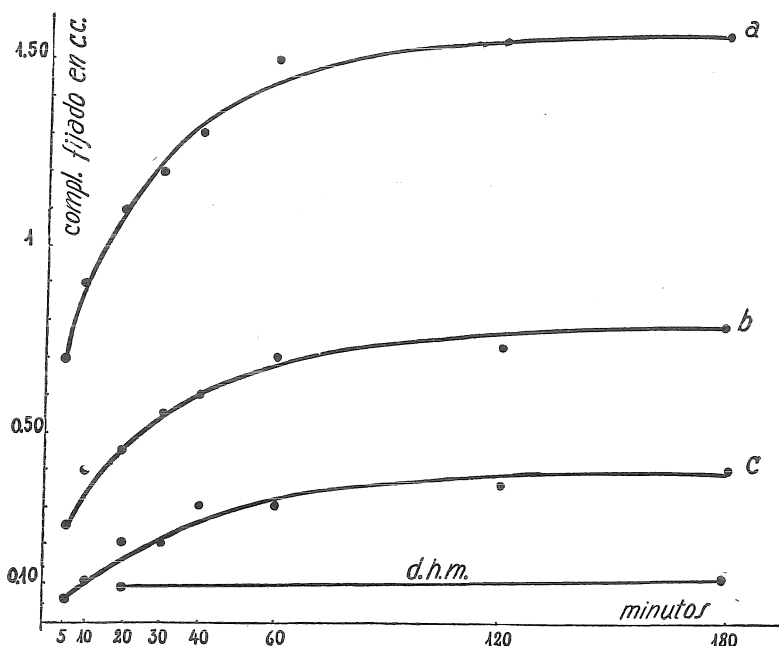


GRÁFICO N° 2. — Tiempo de transformación de una cantidad de complemento cuando la concentración inicial de los reactivos varía en un 50 %.

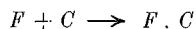
nos permite acusar sólo la transformación completa de una cantidad dada de complemento, esta relación entre tiempo  $t$  y concentración inicial  $a$ ,  $t \propto \frac{k}{a}$  revela la influencia de la concentración de ambos reactivos sobre la velocidad de la reacción.

(\*) Los resultados observados en este protocolo han sido confirmados por el estudio de diez sueros diferentes realizando con ellos sesenta experimentos. La relación anotada entre concentración inicial y tiempo necesario para transformar una fracción dada de complemento presenta a veces desviaciones que no llegan a ser significativas. Los resultados obtenidos en cada caso han sido confirmados por muestras de diferentes sangrías. En un suero examinado (A. C.) estas relaciones no se han cumplido.

Por tanto, a pesar de tratarse de una reacción que se efectúa en un sistema de la complejidad anotada cuya representación estequiométrica sería,



y sea cualquiera el tamaño de los agregados que se forman por la unión del complemento con el complejo fijador, el estudio de la cinética de esta reacción acusa un proceso en el cual hemos podido comprobar la variación concomitante de igual número de unidades reactivas de ambas sustancias, a pesar de que la reacción se realiza en presencia de un exceso de complejo fijador. La ecuación que representaría el mecanismo de combinación del complejo fijador con el complemento sería



Además, teniendo en cuenta el estado de dispersión de las sustancias que integran el sistema, el hecho que observemos netamente una relación entre concentración inicial y velocidad como la anotada, indica que ésta es menor que la velocidad de difusión de los reactivos, por lo cual imprime sus características a la resultante final de las fuerzas que integran la reacción que estudiamos.

#### CONSIDERACIONES

En los experimentos que acabamos de exponer hemos examinado la velocidad de reacción entre un complejo fijador óptimo y el complemento. La razón por la cual hemos elegido para nuestros estudios (en el presente trabajo así como en (1) y (2)) esta mezcla particular de antígeno-anticuerpo  $A_xG_y$  se debe al hecho de que la cantidad de complemento fijado por unidad de complejo fijador no se altera cuando este último varía, ésto es, para la relación de  $x$  e  $y$  anotada,  $C/F = K$ . (\*).

Si consideramos los complejos fijadores  $A_xG_y$  en los cuales  $y$  con respecto a  $x$  es mayor que en la mezcla óptima, la relación  $C/F$  presenta anomalías cuando  $F$  aumenta (Gráfico N° 3).

En cambio, en los complejos  $A_xG_y$  en los cuales  $y$  con respecto a  $x$  es menor que en la mezcla óptima,  $C/F$  a igual que en esta última, se mantiene constante cuando  $F$  varía (Gráfico N° 4). La mezcla óptima marca así el comienzo de una serie de complejos con

(\*) Denominamos  $C$  la cantidad de complemento en dosis hemolticas mínimas y  $F$  las unidades de complejo fijador.

exceso de anticuerpo los cuales a pesar de tener menor afinidad por el complemento presentan las mismas características en cuanto a la relación cuantitativa con este último. Ello indica que aun cuando no se ha podido demostrar la combinación directa del complemento con el anticuerpo, éste regula la relación estequiométrica entre el antígeno sensibilizado y el complemento.

A este respecto debemos recordar la primordial importancia que Ehrlich atribuía al anticuerpo en la fijación del complemento, como también que Dean (3) en su estudio sobre la relación entre

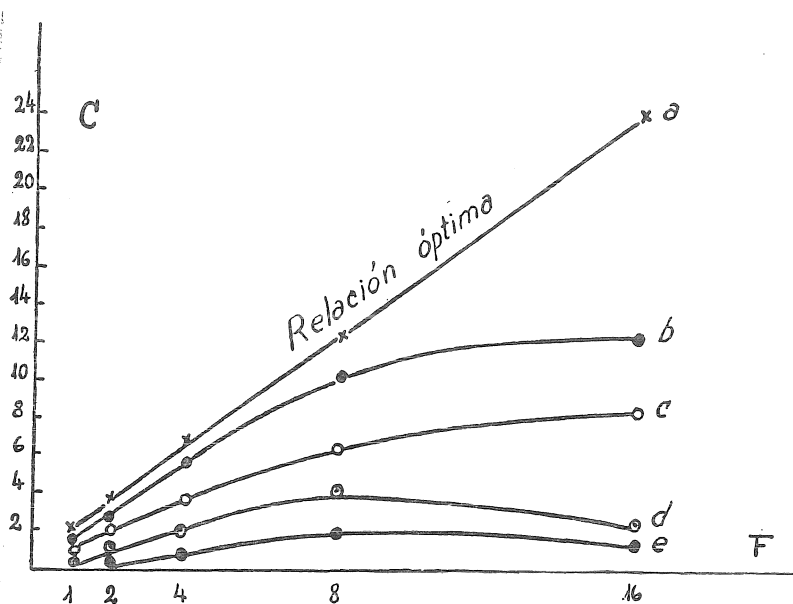


GRÁFICO N° 3. — Relación  $C/F$ , cuando  $F$  contiene exceso de antígeno. a: 3,12 gamas de antígeno + 0,02 cc. de suero; b: 6,25 gamas de antígeno + 0,02 cc. de suero; c: 12,5 gamas de antígeno + 0,02 cc. de suero; d: 25 gamas de antígeno + 0,02 cc. de suero; e: 50 gamas de antígeno + 0,02 cc. de suero.

precipitación y fijación de complemento observó que la mezcla antígeno-anticuerpo que da la mayor fijación de complemento se halla desplazada hacia la zona de exceso de anticuerpo si se compara con la mezcla que determina precipitación óptima, y la función preponderante que Heidelberger (4) adjudica al anticuerpo en la unión del complemento con los agregados antígeno-anticuerpo en la zona de equivalencia.

Esta acción determinativa del anticuerpo en la relación cuantitativa entre complejo fijador y complemento que se desprende del estudio de  $C/F$  es apoyado por el hecho observado por nosotros de

que una misma cantidad de  $G_y$  de antígeno, por ejemplo 3,12 gamas, puede dar complejos óptimos  $A_x G_y$  capaces de combinarse con cantidades de complemento que varían entre 24 y 8 dosis hemolíticas mínimas, cuando  $A_x$  proviene de diferentes sueros (ver (2) tablas I y II).

Surge así, del estudio cuantitativo de la combinación antígeno-anticuerpo y complemento que el anticuerpo imprime al complejo fijador la valencia frente a las unidades de complemento.

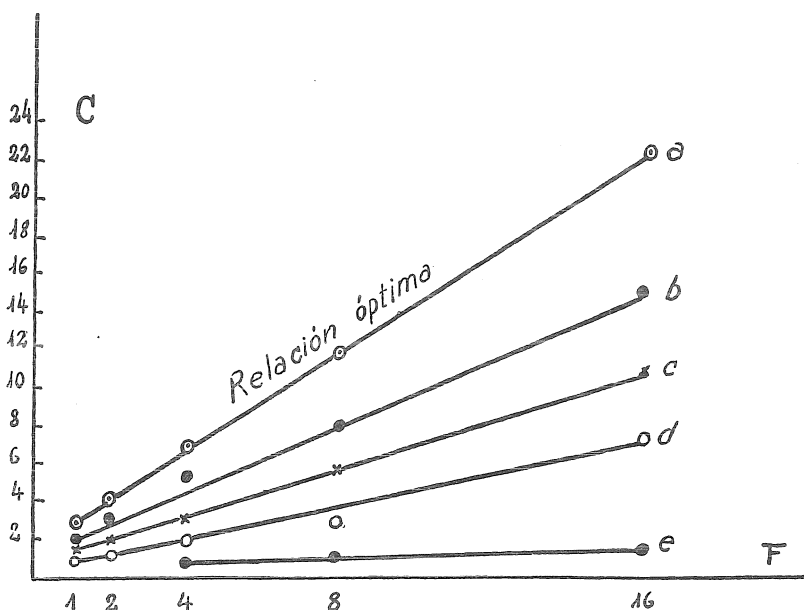


GRÁFICO N° 4. — Relación C/F, cuando F contiene exceso de anticuerpo (\*). a, b, c, d, e: 3,12 1,56, 0,78, 0,39, 0,195 gamas de antígeno + 0,02 cc. de suero, respectivamente.

Si por otra parte consideramos el mecanismo por el cual se realiza esta unión, penetramos en el dominio de las reacciones químicas. Hemos visto que se trata de una reacción con coeficiente de temperatura positivo y si bien el valor de dicho coeficiente es poco mayor que 1 cuando se toma en cuenta la reacción entre los límites máximos de temperatura entre los cuales es posible realizarla ( $0^{\circ}$  -  $37^{\circ}\text{C}$ ), su valor es 4 entre  $5^{\circ}$  y  $10^{\circ}\text{C}$  (1), así mismo la influencia de la concentración de los reactivos sobre la velocidad de la fijación se pone de manifiesto cuando se fracciona el complejo fijador;

(\*) Los valores de los gráficos Nos. 3 y 4 corresponden a la Tabla I publicados en (1).

en este caso se puede obtener el mismo valor de complemento fijado que en el experimento en el cual los reactivos no se han fraccionado, prolongando sólo el tiempo de contacto (<sup>2</sup>). Esta influencia de la concentración también se revela al estudiar el desgaste del complemento en función del tiempo (parágrafo A). Las fuerzas específicas que gobiernan esta reacción son evidenciadas una vez más cuando se estudia la relación entre el tiempo necesario para transformar una fracción dada de los reactivos cuando la concentración inicial de estos varía en un cincuenta por ciento (parágrafo B).

Ello no excluye que en condiciones experimentales dadas (fraccionamiento del complemento (<sup>2</sup>)) se pueden hacer aparecer fuerzas inespecíficas que alteran las unidades de complemento fijadas por un mismo complejo fijador. Pero en el sistema por nosotros estudiado, estos fenómenos de saturación inespecífica a los cuales Bordet diera fundamental importancia, resultan secundarios.

Teniendo en cuenta los hechos observados surge claramente que el neto fenómeno de la reacción entre los polos activos del complemento y complejo fijador, es de los mecanismos que intervienen en la reacción aquél que rige fundamentalmente el proceso estudiado.

#### RESUMEN

Se ha estudiado la velocidad de reacción de un sistema constituido por un complejo fijador óptimo y el complemento.

El desgaste del complemento en función del tiempo indica que la velocidad de reacción es proporcional a la concentración de los reactivos.

Cuando la concentración inicial de los reactivos varía en un 50 % y se determina el tiempo necesario para transformar una cantidad dada de complemento, se encuentra una relación inversa entre el tiempo y la concentración inicial.

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) R. DE PIROSKY, IG. PIROSKY y R. DE YALOV. — *Rev. Inst. Bact. « Dr. Carlos. G. Malbrán »*, **10**, 242-257, 1941.
- (2) R. DE PIROSKY, IG. PIROSKY y S. DE YALOV. — *Rev. Inst. Bact. « Dr. Carlos Malbrán »*, 1942 (en prensa).
- (3) DEAN, H. R. — *Zeitsch. f. Immun. forsch.*, **13**: 84, 1912.
- (4) HEIDELBERGER, M.; WEIL, A., y TREFFERS, H. P. — *Jour. Exp. Med.*, **73**: 695, 1941.